

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E DE RESISTÊNCIA À
Ralstonia solanacearum NA CULTURA DA BATATA
NO RIO GRANDE DO SUL

José Ricardo Pfeifer Silveira
Engenheiro Agrônomo/UFGRS

Tese apresentada como um dos
requisitos à obtenção do Grau de
Doutor em Fitotecnia
Área de Concentração Fitossanidade

Porto Alegre (RS), Brasil
Fevereiro de 2002

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO I	1
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Caracterização de <i>Ralstonia solanacearum</i>	2
1.2 Sintomas	5
1.3 Epidemiologia	7
1.4 Controle	8
1.5 Incidência de biovars de <i>Ralstonia solanacearum</i> em lavouras de batata no RS	11
1.6 Diversidade genética de <i>Ralstonia solanacearum</i>	13
1.7 Resistência à <i>Ralstonia solanacearum</i>	17
1.8 Infecções latentes por <i>Ralstonia solanacearum</i>	19
CAPÍTULO II	22
2. Incidência das biovars 1 e 2 de <i>Ralstonia solanacearum</i> em lavouras de batata no Estado do Rio Grande do Sul	22
2.1 Introdução	22
2.2 Material e Métodos	24
2.2.1 Obtenção das amostras e isolamento de <i>Ralstonia</i> <i>solanacearum</i>	24
2.2.2 Determinação da biovar	25
2.2.2.1 Testes bioquímicos	25
2.2.2.2 Reação em cadeia da polimerase	26
2.3 Resultados e Discussão	28
CAPÍTULO III	33
3. Caracterização de estirpes de <i>Ralstonia solanacearum</i> , isoladas de plantas de batata com murcha bacteriana no Rio Grande do Sul, por PCR-rep e RAPD	33
3.1 Introdução	33
3.2 Material e Métodos	37
3.2.1 Extração do DNA	40
3.2.2 PCR-BOX, ERIC e RAPD	41
3.2.3 Análise de agrupamento	42
3.3 Resultados e Discussão	43

CAPÍTULO IV	50
4. Progresso da murcha bacteriana em cultivares e clones de batata a campo e presença de <i>Ralstonia solanacearum</i> em tubérculos oriundos de plantas assintomáticas	50
4.1 Introdução	50
4.2 Material e Métodos	54
4.2.1 Local, data e delineamento	54
4.2.2 Progresso da murcha bacteriana	54
4.2.3 Presença de <i>Ralstonia solanacearum</i> nos tubérculos oriundos de plantas assintomáticas	56
4.3 Resultados e Discussão	59
4.3.1 Avaliações das áreas sob as curvas de progresso da doença	59
4.3.2 Ajuste das curvas de progresso da doença aos modelos epidemiológicos	64
4.3.3 Detecção de <i>Ralstonia solanacearum</i> em tubérculos de plantas sem sintomas	74
5. CONCLUSÕES	78
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
7. APÊNDICES	89

RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO II

- 1 - Regiões agroecológicas do Estado do Rio Grande do Sul onde foram coletadas plantas de batata com sintomas de murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*, em lavouras de produção. Porto Alegre, RS, 2002. 25

CAPÍTULO III

- 1 - Produto da amplificação do DNA de isolados de *Ralstonia solanacearum* por PCR-ERIC. (M) Marcador de peso molecular 1 Kb, (1) Isolado CB12, (2) CB15, (3) IB12, (4) IB18, (5) SL14, (6) SL16, (7) NP23, (8) NP35, (9) isolado de referência RS45, (10) GA11, (11) GA17, (12) SM37, (13) SM316, (14) Isolado de referência RS72, (15) Água. Porto Alegre, RS, 2002. 44
- 2 - Produto da amplificação do DNA de isolados de *Ralstonia solanacearum* por PCR-BOX. (M) Marcador de peso molecular 1 Kb, (1) Isolado FA13, (2) FA15, (3) ST33, (4) ST35, (5) PE11, (6) PE18, (7) SJ15, (8) SJ23, (9) isolado de referência RS45, (10) GA11, (11) GA17, (12) SM37, (13) SM316, (14) Isolado de referência RS127, (15) RS72, (16) RS116, (17) Água. Porto Alegre, RS, 2002. 45
- 3 - Produto da amplificação do DNA de isolados de *Ralstonia solanacearum* por PCR-RAPD. (M) Marcador de peso molecular 1 Kb, (1) Isolado PE12, (2) PE18, (3) ST218, (4) ST219, (5) SL16, (6) SL18, (7) NP16, (8) NP35, (9) NP19, (10) IB12, (11) IB27, (12) SJ15, (13) SJ35, (14) SM317, (15) SM316, (16) SM319, (17) GA11, (18) GA17, (19) CB112, (20) Isolado de referência RS6, (21) RS26, (22) RS72, (23) RS127, (24) RS116, (25) Água. Porto Alegre, RS, 2002. 47
- 4 - Dendrograma baseado no método UPGMA, de acordo com perfis de amplificação gerado por PCR-RAPD dos isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos de lavouras de produção de batata no RS. Porto Alegre, RS, 2002. ST (Santa Maria), FA (Farroupilha), SM (Silveira Martins), CB (Carlos Barbosa), SJ (São Jorge), IB (Ibiraiaras), NP (Nova Prata), SL (São Lourenço), PE (Pelotas), GA (Garibaldi), IR (Isolado de Referência). Porto Alegre, RS, 2002. 49

CAPÍTULO IV

- | | |
|---|----|
| <p>1 – Incidência de murcha bacteriana em plantas de batata com sintomas, média de cinco repetições. Cultivares plantadas em área naturalmente infestada com <i>Ralstonia solanacearum</i>. Dados relativos ao período 1999/2000, com data de plantio de 18/10/99. A – Cultivares que até os 60 dias após o plantio (17/12/99) não apresentaram sintomas de murcha; B - Cultivares que manifestaram sintomas antes dos 60 dias após o plantio. Porto Alegre, RS, 2002.</p> | 61 |
| <p>2 – Incidência de murcha bacteriana em plantas de batata com sintomas, média de cinco repetições. Cultivares plantadas em área naturalmente infestada com <i>Ralstonia solanacearum</i>. Dados relativos ao período (2000/2001), com data de plantio de 09/10/00. A – Cultivares que até os 50 dias após o plantio (30/11/00) não apresentaram sintomas de murcha; B - Cultivares que manifestaram sintomas antes dos 50 dias após o plantio. Porto Alegre, RS, 2002.</p> | 62 |
| <p>3 – Área sob a curva de progresso da doença (ASCPD) e número de dias após o plantio antes do início do aparecimento de sintomas a campo, em plantas de cultivares e clones de batata plantados em área naturalmente infestada com <i>Ralstonia solanacearum</i> ($p > 0,001$). Período 1999/2000 ($r = -0,9227$); Período 2000/2001 ($r = -0,8794$). Porto Alegre, RS, 2002.</p> | 68 |
| <p>4 – Curvas de incidência estimada (%) de murcha bacteriana, pelo tempo (dias), para o modelo logístico não linearizado das cultivares Achat, Baraka, Baronesa, Bintje, Catucha e Clone A, relativas aos períodos de 1999/2000 e 2000/2001. Porto Alegre, RS, 2002.</p> | 72 |
| <p>5 – Curvas de incidência estimada (%) de murcha bacteriana, pelo tempo (dias), para o modelo logístico não linearizado das cultivares Contenda, Dr. McIntosh, Fina, Granola, Monalisa e Rheinhort, relativas aos períodos de 1999/2000 e 2000/2001. Porto Alegre, RS, 2002.</p> | 73 |

RELAÇÃO DE TABELAS

Página

CAPÍTULO II

- 1 – Incidência das biovares 1 e 2 de *Ralstonia solanacearum* em lavouras de produção de batata de quatro regiões agroecológicas do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, 2002. 29

CAPÍTULO III

- 1 – Biovares de *Ralstonia solanacearum* obtidos de plantas de batata de lavouras das diferentes regiões produtoras do RS e avaliados por PCR-ERIC, BOX e RAPD. Porto Alegre, RS, 2002. 38

CAPÍTULO IV

- 1 – Resultado da análise de regressão linear para o modelo logístico, relativo ao progresso da murcha bacteriana em cultivares e clones de batata plantados em área naturalmente infestada por *Ralstonia solanacearum*, em dois períodos. Porto Alegre, RS, 2002. 65
- 2 – Resultado da análise de regressão para o modelo logístico não linearizado, relativo ao progresso da murcha bacteriana em cultivares e clones de batata plantados em área naturalmente infestada por *Ralstonia solanacearum*, em dois períodos. Porto Alegre, RS, 2002. 70
- 3 – Equações ajustadas ao modelo logístico não linearizado, relativas ao progresso da murcha bacteriana em cultivares e clones de batata plantados em área naturalmente infestada por *Ralstonia solanacearum*, em dois períodos. Porto Alegre, RS, 2002. 71
- 4 – Número de amostras positivas para *Ralstonia solanacearum* pelos testes de DAS-ELISA e PCR, de tubérculos obtidos de plantas sem sintomas de murcha bacteriana, das cultivares e clones de batata plantados em área naturalmente infestada em dois períodos. Porto Alegre, RS, 2002. 75

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E DE RESISTÊNCIA À *Ralstonia solanacearum* NA CULTURA DA BATATA NO RIO GRANDE DO SUL^{1/}

Autor: José Ricardo Pfeifer Silveira
Orientador: Valmir Duarte

RESUMO

Plantas de batata (*Solanum tuberosum* L.) com sintomas de murcha bacteriana (MB) foram coletadas em 25 lavouras de 10 municípios de quatro regiões produtoras do Rio Grande do Sul (RS), de setembro a dezembro de 1999. Quatrocentos e noventa isolados de *Ralstonia solanacearum* foram obtidos e 96 e 4% identificados como biovars 1 e 2, respectivamente. A análise dos resultados da PCR-ERIC e BOX de 13 estirpes da biovar 1 e 72 da biovar 2 demonstrou baixa variabilidade genética. Através de RAPD foi possível associar local de origem do isolado com perfil eletroforético. Em outro experimento avaliou-se o comportamento de 14 cultivares e clones de batata cultivados nos períodos das safras de primavera de 1999 e 2000, em uma área naturalmente infestada com a biovar 2, em Caxias do Sul, RS. O número de plantas com sintomas foi registrado semanalmente. Os tubérculos produzidos por plantas assintomáticas foram coletados e submetidos a testes para detectar a presença de *R. solanacearum*. A área sob a curva de progresso da doença foi utilizada para comparar a resistência dos genótipos de batata à MB e o modelo logístico foi o que melhor se ajustou. A cultivar cruza 148 e o clone MB 03 mostraram-se como os mais resistentes, apresentando, no entanto, tubérculos com infecções latentes. As implicações da incidência de *R. solanacearum* em lavouras de batata e de sua variabilidade genética, assim como da resistência dos genótipos acompanhada de infecções latentes, no manejo integrado da MB no RS foram discutidas.

^{1/} Tese de Doutorado em Fitotecnia, área de concentração Fitossanidade - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (104p.). Fevereiro, 2002.

ASPECTS OF EPIDEMIOLOGY AND RESISTANCE TO *Ralstonia solanacearum* ON THE POTATO CROP IN RIO GRANDE DO SUL^{1/}

Author: José Ricardo Pfeifer Silveira

Adviser: Valmir Duarte

SUMMARY

Potato plants (*Solanum tuberosum* L.) with Bacterial Wilt (BW) symptoms were collected in 25 fields from 10 counties of four production regions in Rio Grande do Sul (RS), from September to December, 1999. Four hundred and ninety isolates of *Ralstonia solanacearum* were obtained and 96 and 4% identified as biovars 1 and 2, respectively. Results of ERIC and BOX-PCR of 13 strains biovar 1 and 72 biovar 2, showed low genetic variability. RAPD allowed the link between the origin site of the bacterial isolate and the electrophoretic profile. In another experiment, resistance of 14 potato cultivars and clones was evaluated by growing them for two seasons in a naturally infested area with biovar 2 in Caxias do Sul, RS. The number of symptomatic plants was recorded weekly. Tubers produced by symptomless plants were collected and tested for *R. solanacearum* presence. Area Under Disease Progress Curve was calculated to compare genotype resistance to BW, and the logistic model was the most suitable. Cultivar Cruza 148 and clone MB03 were the most resistance. However, both genotypes produced tubers with latent infections. Implications of the incidence of *R. solanacearum* in potato fields and its genetic variability, as well as the resistance of potato genotypes associated with latent infections, on BW management in RS were discussed.

^{1/} Doctor's Thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (104p.) – February, 2002.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A murcha bacteriana (MB), causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. (1995), é uma das maiores limitações do cultivo da batata (*Solanum tuberosum* L.) em regiões de clima tropical, subtropical e zonas mais quentes de clima temperado em todo o mundo. *Ralstonia solanacearum* tem sido classificada em raças, de acordo com a espécie hospedeira e em biovars, de acordo com a habilidade de digerir determinados açúcares e alcoóis. Dois grupos de estirpes são capazes de infectar a cultura da batata, o pertencente à biovar 1, que corresponde a raça 1, com um grande número de espécies hospedeiras e que atuam com predominância em regiões de clima quente, e o grupo pertencente à biovar 2, que corresponde à raça 3, composto por estirpes que infectam basicamente a cultura da batata em regiões de clima temperado.

As medidas de controle da murcha bacteriana mais eficientes são ações preventivas, como o uso de tubérculos-semente livres do patógeno e o plantio em áreas não infestadas. O manejo integrado da doença abrange a utilização de cultivares resistentes e modelos apropriados de práticas culturais que levam em consideração a biovar presente no local, uma vez que o comportamento entre biovars difere.

Ralstonia solanacearum é considerada endêmica no Estado do Rio Grande do Sul (RS). Presume-se que estirpes da biovar 2 predominem devido às condições de clima. Estirpes deste grupo são mais factíveis de serem erradicadas do que estirpes da biovar 1. No entanto, estirpes da biovar 2 possuem maior capacidade de se estabelecerem na forma de infecções latentes em tubérculos, sendo esta a justificativa de sua disseminação pelo mundo.

A resistência genética, embora seja a alternativa mais desejada de controle da MB, não tem demonstrado estabilidade, variando com o clima e local. A variabilidade genética das estirpes do patógeno mostra-se associada a alterações climáticas nas diferentes regiões geográficas. Por isso, os programas de melhoramento devem basear-se na avaliação de genótipos em áreas de diversas regiões onde prevalecem as estirpes locais.

Considerando a necessidade de informações sobre o patógeno na cultura da batata no RS e a sua importância para o desenvolvimento de estratégias de controle integrado da doença, o presente trabalho teve por objetivos (i) verificar a incidência de biovares de *R. solanacearum* em lavouras de produção de batata nas quatro principais regiões agroecológicas do RS, (ii) determinar a variabilidade genética das estirpes oriundas destes locais e (iii) avaliar a resistência de cultivares e clones de batata em área do RS naturalmente infestada por estirpes da biovar 2.

1.1. Caracterização de *Ralstonia solanacearum*

A murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. 1995; sin. *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith está

amplamente distribuída em regiões de clima tropical, subtropical e zonas mais quentes de clima temperado em todo o mundo (Hayward, 1991). O patógeno é considerado endêmico em muitas áreas e está associado a mais de 200 espécies de plantas cultivadas e silvestres de, pelo menos, 50 famílias diferentes (Hayward, 1995; Saile et al., 1997; Kelman, 1998). As espécies de importância econômica mais afetadas são, principalmente, solanáceas como a batata, o tomate, o pimentão, a berinjela e o fumo e, de outras famílias botânicas tais como a bananeira, o amendoim e o gengibre (Takatsu & Lopes, 1997).

A capacidade de *R. solanacearum* afetar o maior número de espécies que qualquer outra bactéria fitopatogênica é condizente com a complexidade da espécie (Hayward, 1991; Kelman, 1998). Estirpes de *R. solanacearum* diferem quanto às hospedeiras, distribuição geográfica, patogenicidade, relacionamento epidemiológico e propriedades fisiológicas (Buddenhagen & Kelman, 1964; Hayward, 1991). Embora não faça parte dos critérios do Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias, *R. solanacearum* tem sido classificada em raças com base na relação de hospedeiros e em biovares de acordo com a capacidade de oxidar determinados dissacarídeos e alcoóis (Hayward, 1991). Apesar de bastante utilizada, a classificação em raças e biovares não possui uma divisão claramente definida entre as mesmas (Hayward 1994). A raça 1 sobrepõe-se a divisão de biovares (Gillings & Fahy, 1993) e não constitui um agrupamento natural, mas compreende diferentes fenótipos com distintos genótipos e filogenia (Hayward, 1994). Estirpes da raça 1 caracterizam-se por afetar um maior número de espécies hospedeiras, principalmente solanáceas. A raça 2 afeta as musáceas como a bananeira

triplóide e *Heliconia* sp. e a raça 3 a batata e o tomateiro (Buddenhagen et al., 1962).

Inicialmente, estirpes de *R. solanacearum* foram classificadas em quatro biovars de acordo com a capacidade de oxidar os açúcares celobiose, lactose, e maltose e os alcoóis dulcitol, manitol e sorbitol (Hayward, 1964). As estirpes das biovars 1 e 2 estão amplamente distribuídas, sendo que a biovar 1 predomina em regiões de clima quente e caracteriza-se por afetar um maior número de espécies hospedeiras. A biovar 2 corresponde à raça 3 e predomina em regiões de clima temperado, sendo composta por estirpes que infectam basicamente a cultura da batata. A biovar 3 está mais adaptada às regiões quentes dos trópicos (Hayward, 1991). A inclusão de novas raças e biovars tem sido proposta (Hayward, 1994). He et al. (1983) obtiveram uma série de isolados de amoreira (*Morus alba* L.) na China, os quais oxidavam manitol, mas não sorbitol ou dulcitol e foram designados biovar 5.

A aparente homogeneidade das biovars pode diminuir com a adição de outros critérios fenotípicos, como foi demonstrado com isolados da biovar 2 mantidos na coleção do Centro Internacional de la Papa, em Lima, Peru (Hayward, 1994). Isolados da biovar 2, considerados previamente como homogêneos quanto às características fenotípicas, revelaram a existência de novos fenótipos quando adicionados os açúcares trealose, meso-inositol e D-ribose e certos ácidos orgânicos, bem como a determinação da atividade pectolítica e de redução de nitrato. Com base nestes critérios adicionais, novos fenótipos foram obtidos de isolados da biovar 2. Dois destes foram relacionados como biovar 2A e se diferenciaram em poucos critérios, apresentaram semelhanças a nível genético molecular e foram considerados

iguais à raça 3. O terceiro fenótipo é muito mais distinto dos demais pelos critérios adicionais, considerado mais ativo bioquimicamente bem como mais heterogêneo a nível molecular em relação ao genótipo e foram relacionados como biovar 2T (Hayward, 1994). De acordo com French et al. (1993), os fenótipos patogênicos à batata, relacionados à raça 3 foram designados como biovar 2A (A de Andino) e as estirpes das áreas de baixa altitude da região tropical relacionadas ao terceiro fenótipo mencionado anteriormente, foram designadas de biovar 2T (T de tropical). As estirpes apresentando este último fenótipo foram designadas por Gillings & Fahy (1993) como biovar N2 (baixa altitude) e, com base em análise de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), consideradas geneticamente relacionadas à raça 1. A nomenclatura destes fenótipos encontra-se em fase de transição, propiciando alguma confusão (Hayward, 1994).

Com base na técnica de hibridização de DNA, *R. solanacearum* pertence ao grupo II de homologia do segmento 16S do rRNA (ribossomal) e a subdivisão beta da classe Proteobacteria, juntamente com *Pseudomonas syzygii* e *R. pickettii* (Palleroni et al., 1973). Com base nos resultados de caracterização fenotípica, lipídeos celulares e composição de ácidos graxos, análises filogenética da seqüência de nucleotídeos do 16S rDNA e homologia de DNA, o genero *Burkholderia* foi proposto (Yabuuchi et al., 1992), sendo posteriormente transferido para *Ralstonia* (Yabuuchi et al., 1995).

1.2. Sintomas

A murcha bacteriana caracteriza-se pelo sintoma da perda da turgescência dos tecidos foliares e das partes mais suculentas dos ramos da

planta. O sintoma inicia nas folhas mais novas e evolui para toda a planta. Inicialmente, uma só haste pode apresentar os sintomas, no entanto, se o desenvolvimento da doença for mais rápido, todas as folhas podem murchar completamente. Em plantas jovens de cultivares suscetíveis, a murcha das folhas e o colapso das hastes podem ser severos (Kelman, 1986).

Ralstonia solanacearum normalmente invade as hospedeiras através das raízes, penetra no xilema e então coloniza os tecidos aéreos causando sintomas de murcha. A entrada do patógeno ocorre, geralmente, através de ferimentos ou aberturas naturais, tais como os pontos nos quais emergem as raízes secundárias e células parcialmente esfoliadas da camada externa do parênquima (Saile et al., 1997). Todas as estirpes virulentas de *R. solanacearum* produzem grandes quantidades de exopolissacarídeo (EPS). O EPS auxilia as células bacterianas a se manterem agregadas, causando a oclusão dos vasos, podendo, também, prevenir o patógeno de ser reconhecido e imobilizado pelos componentes da planta tais como lecitinas, uma condição necessária para a indução da hipersensibilidade em interações compatíveis (Trigalet-Demery et al., 1993).

O sintoma de murcha é resultante da obstrução dos vasos do xilema, que ficam preenchidos pelo patógeno e por gomas e tiloses formadas pelo hospedeiro em resposta à colonização dos tecidos. O bloqueio gradual dos vasos dificulta o transporte de água, causando o desequilíbrio hídrico da planta que resulta no sintoma de murcha. Plantas infectadas produzem hastes e tubérculos com descoloração vascular e exsudação de pus bacteriano. Podem apresentar, também, epinastia foliar e formação de raízes adventícias, devido ao desequilíbrio de auxina e etileno (Buddenhagen & Kelman, 1964).

1.3. Epidemiologia

Dentre os aspectos epidemiológicos da murcha bacteriana, a sobrevivência do patógeno em áreas infestadas, as formas de disseminação e o ambiente, em especial a temperatura, são os mais importantes. *R. solanacearum* possui baixa capacidade de sobrevivência no solo, podendo estar associado a infecções sistêmicas ou localizadas em raízes de plantas hospedeiras resistentes ou assintomáticas. De acordo com Takatsu & Lopes (1997), a maioria das plantas hospedeiras pode ser assintomática ou não suscetível e atuar como melhores mantenedoras do patógeno, do que plantas suscetíveis.

Estirpes de *R. solanacearum* diferem na gama de hospedeiras, distribuição geográfica, patogenicidade, relacionamento epidemiológico e propriedades fisiológicas, de modo que a biovar 1 e a biovar 2, que infectam a batata, são bastante distintas das demais biovars (Hayward, 1995). Entre as biovars 1 e 2 também existem características distintas. A biovar 1 ocasiona doenças basicamente de solo, ocorrem em climas mais quentes (26 a 36 °C) e possui uma maior relação de hospedeiras cultivadas e silvestres, enquanto que a biovar 2 ocorre em regiões mais frias (15 a 20 °C) e afeta quase exclusivamente a batata em condições naturais (Hayward, 1991; Lopes, 1994).

Tradicionalmente considerado como um dos mais sérios patógenos da batata nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, *R. solanacearum* teve recentemente aumentada a sua importância na Europa depois de surtos em áreas de produção de batata na Suécia, Bélgica, França, Itália, Holanda, Portugal e Inglaterra (Elphinstone et al., 1996, 1998).

As infecções latentes são de particular importância na cultura da batata. Segundo Hayward (1991), os tubérculos-semente infectados constituem a fonte de inóculo mais importante para a disseminação do patógeno. Embora alguns aspectos deste fato seja conhecido há muitos anos, a importância do período quarentenário pelo intercâmbio de material vegetal propagativo potencialmente capaz de carregar *R. solanacearum* tem sido subestimada. A disseminação de *R. solanacearum* biovar 2 em nível mundial está associada com tubérculos de batata, nos quais populações latentes do patógeno podem colonizar os tecidos vasculares sem induzir sintomas da doença (Ciampi et al., 1980; Hayward, 1991).

De acordo com Lopes (1994), está bem documentado que *R. solanacearum* permanece em condição assintomática em lenticelas na superfície dos tubérculos e no tecido vascular da batata. Esta característica possui importante papel na determinação do inoculo primário na cultura e o seu risco aumenta, naturalmente, em cultivares com maior grau de resistência por propiciar a disseminação do patógeno em um material aparentemente saudável. Em outras circunstâncias, a cultivar pode ser suscetível, porém a doença não se manifesta devido a baixas temperaturas e os sintomas só se expressam quando os tubérculos colhidos são incubados ou plantados sob temperaturas favoráveis à expressão da doença (Hayward, 1991).

1.4. Controle

Por ser um patógeno adaptado a um grande número de plantas hospedeiras, sob as mais variadas condições de clima e solo, torna-se difícil

desenvolver estratégias efetivas de controle, devido, principalmente, à falta de conhecimentos básicos sobre a ecologia e evolução de *R. solanacearum*. Entretanto, estratégias de controle da doença para a cultura da batata têm sido estabelecidas (French, 1994; Lopes, 1994). O sistema de controle integrado abrange a utilização de cultivares resistentes e modelos apropriados de práticas culturais, que podem alterar de modo adequado o microambiente para o patógeno e, deste modo, influenciar a incidência da doença (Elphinstone & Aley, 1993). A eficiência deste sistema em particular é específica para uma determinada localidade, uma vez que está sujeita a características específicas que variam, principalmente, em função da estirpe bacteriana, onde o comportamento das estirpes da biovar 1 é bastante diferente das estirpes da biovar 2, além de toda uma variação existente entre isolados da mesma biovar (Lopes, 1994; Lopes & Takatsu, 1997).

Entre as principais características que diferenciam a biovar 1 da biovar 2, destacam-se: (a) a biovar 1 ocasiona basicamente doenças de solo, enquanto que a biovar 2 é responsável principalmente por uma doença relacionada à batata-semente; (b) a biovar 1 ocorre mais em climas quentes, enquanto a biovar 2 ocorre em regiões mais frias; e (c) a biovar 1 possui uma extensa relação de espécies hospedeiras cultivadas e silvestres, enquanto a biovar 2 ataca quase que exclusivamente a batata sob condições naturais (Lopes & Giordano, 1983; Hayward, 1991; Elphinstone & Aley, 1993; Lopes, 1994). Com base nestas informações Lopes (1994), considera que a biovar 2 é mais factível de ser erradicada do que a biovar 1.

Segundo Elphinstone & Aley (1993), a melhor forma de se evitar este problema é assegurar-se que o solo e os tubérculos-semente utilizados para

plântio estejam livres do patógeno. A produção de batata-semente em um sistema de certificação depende da produção de material de qualidade e comprovadamente livre do patógeno em áreas livres da doença e do estabelecimento de quarentena de modo a evitar a infestação de solos livres da bactéria. Em áreas já infestadas, como resultado de infestações prévias ou de hospedeiras silvestres do patógeno, a utilização de batata-semente certificada é dispensável do ponto de vista econômico e a supressão de *R. solanacearum* do solo é melhor alcançada por medidas complementares (Elphinstone & Aley, 1993).

Em países que utilizam técnicas avançadas para diagnose em programas de produção de batata-semente, as técnicas de rotina utilizadas para detecção do patógeno no solo, plantas e nos tubérculos-semente não têm alcançado o nível de sensibilidade requerido para um procedimento confiável de certificação (Elphinstone et al., 1996, 1998). Meios seletivos de enriquecimento para detecção de *R. solanacearum*, anti-soros específicos (ELISA, imunofluorescência) e técnicas de análise do DNA têm melhorado o nível de sensibilidade, aumentando-a para até 20 células/ml do extrato de tubérculos (Elphinstone et al., 1996; Llop et al., 1999; Martins, 2000).

Em países que não utilizam técnicas avançadas de diagnose, os produtores podem depender apenas da inspeção visual, que constata a presença ou ausência de sintomas, para indicar se os solos e os tubérculos colhidos estão livres do patógeno (Black & Elphinstone, 1998). Entretanto, tubérculos com infecções latentes podem ser obtidos de plantas sem sintomas, particularmente em regiões mais frias em que a expressão dos sintomas é freqüentemente suprimida (Hayward, 1991). Portanto, não existem garantias

de que um campo de produção sem sintomas produzirá uma progênie de tubérculos livres do patógeno. O movimento de tubérculos-sementes de áreas infestadas para não infestadas continua a disseminar *R. solanacearum* em larga escala pelos trópicos e subtropicais, em nível regional e internacional (Elphinstone & Aley, 1993).

A técnica de transgenia tem propiciado pesquisas visando à produção de plantas transformadas com resistência a patógenos (Jaynes et al., 1993; Kuhlenle et al., 1995; Montanelli et al., 1995; Rao, 1995; Zhang et al., 1998). As plantas são modificadas pela inclusão de genes que codificam pequenas proteínas, contendo em torno de 20 a 40 aminoácidos, denominados peptídeos antibióticos. Estas proteínas são componentes naturais do sistema humoral dos insetos, sendo a Cecropina B obtida da mariposa *Hyalophora cecropia*, um dos peptídeos mais utilizados em plantas transformadas (Boman & Hulmark 1987; Boman, 1991; Boman, 1995). Alguns resultados promissores visando resistência à *R. solanacearum* têm sido demonstrados em plantas de batata transformadas com peptídeos análogos a Cecropina B (Jaynes et al., 1993; Montanelli et al., 1995), bem como de peptídeos tais como a lactoferrina, componente do sistema de defesa dos mamíferos (Zhang et al., 1998).

1.5. Incidência de biovars de *Ralstonia solanacearum* em lavouras de batata no RS

De acordo com Hayward (1991), em países como a Argentina, Chile e Uruguai, as estirpes encontradas pertencem à biovar 2. Nas Regiões Sul e

Sudeste do Brasil, estirpes da biovar 2 predominam, mas estirpes da biovar 1 também podem ser isoladas (Lopes et al., 1993; Mariano et al., 1998).

No Estado do Paraná, no município de Contenda, Lopes et al. (1993) identificaram estirpes pertencentes à biovar 1 de *R. solanacearum*, porém, a predominância, nos 15 campos de produção avaliados de sete municípios, foi de estirpes da biovar 2.

No Rio Grande do Sul pressupõe-se que a biovar 2 seja prevalecente, no entanto, há a possibilidade de que estirpes da biovar 1 estejam presentes, em áreas cultivadas com batata, uma vez que já foram obtidos isolados deste grupo em áreas naturalmente infestadas com o patógeno (Maciel, 1999). Segundo Maciel (1999) há a necessidade de se fazer um levantamento das estirpes presentes nas áreas de produção do RS.

A biovar 2, considerada bastante homogênea, foi posteriormente diferenciada em três fenótipos (Hayward, 1994). Dois destes, mais relacionados, diferenciam-se pela utilização de trealose e redução de nitrato. Os isolados pertencentes a estes dois grupos foram considerados biovar 2A e correspondem à raça 3. Estirpes relacionadas a um destes fenótipos ocorrem em todos os continentes e não utilizam trealose. As estirpes relacionadas ao outro fenótipo utilizam trealose e ocorrem somente no Chile e Colômbia. Estirpes relacionadas ao terceiro fenótipo, correspondente à biovar 2T, utilizam trealose, D-ribose e *meso*-inositol (Hayward, 1994) e estão relacionadas à raça 1 (Gillings & Fahy, 1993). De acordo com Hayward (1994), a distribuição geográfica destes fenótipos deveria ser vista com cautela, em particular se o

fenótipo encontrado até agora somente no Chile e Colômbia pode ocorrer em outro lugar da América do Sul ou mesmo em outro continente.

French et al. (1993) analisaram 23 isolados da biovar 2 coletados no Brasil. Entre estes, nove isolados foram relacionados como biovar 2T, sendo quatro de Brasília, um de Minas Gerais e quatro de São Paulo.

As características da variabilidade da biovar 1 estão pouco esclarecidas por causa da magnitude da diversidade genética, já que esta biovar é encontrada no Brasil desde o Rio Grande do Sul até a Amazônia (Takatsu & Lopes, 1997). De acordo com Lopes (1994), devido ao fato da cultura da batata estar mais concentrada em localidades de clima ameno, a biovar 2 é mais importante para a batata que a biovar 1, de clima mais quente. As medidas de controle, entretanto, não devem ser exclusivas, já que é comum haver sobreposição de biovars em uma mesma localidade.

1.6. Diversidade genética de *Ralstonia solanacearum*

Conhecer a estrutura genética da população é fundamental para estudos epidemiológicos e o controle efetivo de doenças, principalmente no que diz respeito ao desenvolvimento de genótipos resistentes (Van der Wolf et al., 1998). Uma grande diversidade genética tem sido encontrada em bactérias de solo e a diferenciação genética destas populações pode chegar ao nível microgeográfico, dependendo do solo e das propriedades da rizosfera dos hospedeiros, como demonstrado para populações de *Burkholderia cepacia* (McArthur et al., 1988; Di Cello et al., 1997). Entretanto, pouco se conhece

sobre os fatores que determinam a estrutura da população de *R. solanacearum* (Jaunet & Wang, 1999).

A utilização de técnicas de análise do DNA tais como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e PCR-rep (Repetitive Extragenic Palindromic) têm-se mostrado muito úteis na caracterização da variabilidade de *R. solanacearum*, principalmente em nível subespecífico (Horita & Tsuchiya, 2001; Martins, 2000; Jaunet & Wang, 1999; Seal et al., 1999; Thwaites et al., 1999; Van der Wolf et al., 1998). Com base em análises de RFLP em uma coleção representativa de *R. solanacearum*, Cook et al. (1989) definiram 28 grupos ou genótipos, utilizando um conjunto de sondas de DNA que codificavam informações requeridas para virulência e hipersensibilidade. Os coeficientes gerados entre os grupos revelaram que *R. solanacearum* é composta de duas divisões distintas. A divisão I com 78% de similaridade, contendo estirpes da raça 1 relacionadas às biovars 3, 4 e 5, e a divisão II com 62% de similaridade, contendo estirpes das raças 1 e 2 relacionadas à biovar 1 e da raça 3 relacionada à biovar 2. Posteriormente, Gillings & Fahy (1993) confirmaram as duas divisões e aumentaram os grupos ou genótipos para 33, com a inclusão das estirpes da biovar 2T (N2), também relacionadas à raça 1. A similaridade entre as duas divisões foi de 13,5% e reflete, provavelmente, um relacionamento filogenético ou evolucionário. A característica mais fortemente correlacionada com os grupos RFLP foi a origem geográfica das estirpes. As estirpes da divisão I são originários da Ásia ou Austrália e da divisão II das Américas.

As estirpes da biovar 2, com centro de origem na região Andina Ocidental, compõem apenas dois grupos de RFLP (26 e 27) bastante homogêneos e geneticamente muito próximos. Foram amplamente distribuídos em tubérculos de batata com infecções latentes (Gillings & Fahy, 1993; Hayward, 1995). No Brasil, a biovar 2 é limitada às regiões de clima ameno do Centro e Sul do País (Takatsu & Lopes, 1997).

A biovar 2T, com centro de origem na região Amazônica, está relacionada a regiões de clima tropical de baixa altitude. Apesar de sua aparência fenotípica bastante homogênea, é composta pelos grupos de RFLP 29, 30 e 32, que são geneticamente heterogêneos. Segundo French et al. (1993), a biovar 2T não foi observada em países de outros continentes entre os numerosos isolados da biovar 2 obtidos de batata. No Brasil, além da região Amazônica, foram obtidos isolados com este fenótipo em Minas Gerais, São Paulo e Distrito Federal.

Apesar de ser útil como indicador geral da gama de hospedeiros para estirpes individuais, a raça 1 sobrepõe às classificações de divisão e biovar e não reflete qualquer relacionamento evolucionário ou filogenético (Gillings & Fahy, 1993). As estirpes da biovar 1 relacionadas à raça 1 apresentam grande variabilidade genética, sendo que, no Brasil, predominam na região Central, mas é encontrada desde o Rio Grande do Sul até o Amazonas (Takatsu & Lopes, 1997).

Diversos outros trabalhos de biologia molecular têm sido realizados no sentido de avaliar a diversidade genética de *R. solanacearum*. Seal et al. (1992), utilizando oligonucleotídeos iniciadores de tRNA (T3A e T5A), agruparam as estirpes de *R. solanacearum* em apenas três diferentes perfis de

amplificação. Van der Wolf et al. (1998) digeriram o DNA genômico de estirpes da raça 3, obtidos na Europa, com enzimas de restrição de corte raro e pela técnica de AFLP separaram as estirpes em diferentes grupos. Trabalhos baseados em PCR-rDNA, utilizando diferentes combinações de oligonucleotídeos iniciadores, permitiram a amplificação de *R. solanacearum*, *P. syzygii* e “Blood Disease Bacterium” (BDB), exceto para isolados da divisão II da Indonésia (Seal et al, 1999).

Os organismos procariotos contêm múltiplas cópias de seqüências extragênicas e repetitivas de DNA, altamente conservadas e dispersas no genoma. Três famílias de seqüências foram identificadas como REP (Repetitive Extragenic Palindromic), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) e BOX elementos, este último contendo três diferentes subunidades denominadas BOX A, BOX B e BOX C (Versalovic et al., 1994). Estes elementos repetitivos têm sido utilizados como sítios para anelamento de oligonucleotídeos iniciadores para reações em cadeia da polimerase (PCR-rep), amplificando segmentos de DNA de diferentes tamanhos entre os elementos repetitivos, gerando assim um perfil genômico individual para as estirpes bacterianas (Versalovic et al., 1991, 1994).

Em trabalhos recentes de avaliação da diversidade genética de *R. solanacearum* por meio de PCR-rep, Horita & Tsuchiya (2001) classificaram 119 estirpes obtidas de diferentes hospedeiras de diversos países, entre estes do Brasil e Japão, em dois grandes grupos semelhantes à divisão previamente estabelecida por Cook et al. (1989) e Gillings & Fahy (1993). Porém, com exceções das estirpes da biovar 1 de Reunion e da biovar N2 do Japão, que foram classificados junto ao grupo correspondente à divisão I de Gillings e

Fahy (1993). Trabalhos anteriores de Tsuchiya & Horita (1998) e Horita e Tsuchiya (1998) descreveram a variabilidade genética de estirpes japonesas de *R. solanacearum*, com base nas técnicas de RFLP e PCR-rep. Martins (2000) avaliou pela técnica de PCR-REP o polimorfismo de 19 estirpes de *R. solanacearum* de diferentes raças, biovars e origem geográfica. Os resultados também mostraram uma tendência biogeográfica consistente com os estudos prévios. O perfil de estirpes das raças 1 e 3 de *R. solanacearum* foi avaliado por macro-restrição do DNA genômico resolvido em eletroforese de campo-pulsado (MR-PFGE) e PCR com oligonucleotídeos iniciadores para as seqüências repetitivas ERIC e BOX (PCR-rep) em estudos biogeográficos realizados por Smith et al. (1998).

1.7. Resistência à *Ralstonia solanacearum*

Dentre as estratégias para controle de *R. solanacearum*, a utilização de cultivares resistentes é considerada a mais importante (Hayward, 1991). No entanto, a resistência genética não tem demonstrado estabilidade em relação ao tempo e ao local, principalmente devido à variabilidade genética das estirpes do patógeno e por alterações climáticas das diferentes regiões geográficas (Rowe & Sequeira, 1970; Tung et al., 1990a). Deste modo, justifica-se o estabelecimento de programas de melhoramento em áreas específicas, levando-se em consideração as estirpes prevalentes em cada local (Lopes & Giordano, 1983). Faltam, também, informações sobre os mecanismos de resistência à murcha, nos diferentes hospedeiros do patógeno (Grimault et al., 1994).

Em batata, a maioria das fontes de resistência à murcha bacteriana é originada de clones de *Solanum phureja*, uma espécie cultivada diplóide (French et al., 1998). Híbridos resistentes de *S. phureja* x *S. tuberosum* têm sido testados em muitos países, sendo que no Peru foram lançadas as cultivares resistentes Coxamarca e Molinera (Ciampi et al., 1980). O ambiente também interfere, principalmente em locais onde as temperaturas são mais elevadas em que a resistência pode ser superada por estirpes específicas do patógeno (Ciampi et al. 1980). A maior dificuldade observada em relação à progênie de *S. phureja*, tem sido a manutenção da resistência, já que esta pode ser quebrada por temperaturas acima de 30 °C (Rowe & Sequeira, 1970). Uma resistência específica a determinadas estirpes do patógeno e instável em relação ao ambiente pode favorecer a disseminação do patógeno por tubérculos sem sintomas (Ciampi et al., 1980).

De acordo com Rowe & Sequeira (1970) a resistência em *S. phureja* é controlada por três genes dominantes e independentes. Posteriormente, Rowe et al. (1972) concluíram que era evidente o fato de que relativamente poucos genes estavam envolvidos na resistência, em um sistema pelo menos parcialmente inter-relacionado, ainda que aparentemente específico para certas estirpes do patógeno. Os trabalhos de Tung et al. (1990a, 1990b) e Tung (1992) avaliaram não só os genes de resistência, mas também genes que conferem adaptação ao ambiente. Concluíram que a resistência em batata é poligênica e que são necessários genes de adaptação ao ambiente para a expressão efetiva da resistência à murcha bacteriana. Resistência a estirpes específicas, entretanto, parece ser característica de *S. phureja*. Programas de melhoramento estão sendo implementados com genes de resistência de

diversas espécies diplóides de *Solanum*, incluindo *S. phureja*, *S. sparsipilum*, *S. chacoense*, *S. microdontum* e *S. raphanifolium*. É provável que a base genética para resistência seja diferente em cada espécie, possibilitando que a resistência nas novas linhagens possam ser controladas poligenicamente. Entretanto, não há informações sobre os padrões de herança da resistência das espécies individuais (Elphinstone, 1994).

Atualmente, uma resistência genética parcial, do tipo horizontal, está disponível somente na cultivar alemã Achat. No entanto, esta cultivar vem sendo substituída gradualmente por cultivares mais suscetíveis, devido a sua baixa qualidade culinária (Reifschneider & Lopes, 1997).

No Brasil, o desenvolvimento de cultivares resistentes a *R. solanacearum* está sendo realizado no Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPH) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), em um projeto conjunto com o Centro Internacional de la Papa (CIP). O CNPH está selecionando genótipos para resistência à murcha bacteriana, a partir de clones obtidos de sementes verdadeiras de batata, originadas de cruzamentos de várias espécies de *Solanum*, portando diferentes genes de resistência. Os clones são selecionados para características comerciais e, posteriormente, semeados em uma área naturalmente infestada por *R. solanacearum* biovar 1. A resistência dos clones é avaliada pela área abaixo da curva de progresso da doença, sendo considerados padrões de resistência as cultivares Achat e Cruza 148 e de suscetibilidade, a cultivar Baronesa (Reifschneider & Lopes, 1997; Quezado-Soares et al., 1997). De acordo com Reifschneider & Lopes (1997), os clones devem ser testados em locais onde ocorra a biovar 2.

1.8. Infecções latentes por *Ralstonia solanacearum*

Bactérias fitopatogênicas encontram-se em fase latente quando posicionadas no tecido suscetível em baixas populações, reduzida ou paralisada multiplicação e ausência de sintomas (Leben, 1965). Infecções latentes por *R. solanacearum* são uma característica comum em suas várias hospedeiras. Materiais de propagação vegetativa como tubérculos, rizomas e mudas são os veículos mais eficientes de disseminação do patógeno a longas distâncias (Takatsu & Lopes, 1997). Segundo Lopes (1994), *R. solanacearum* permanece na condição assintomática em lenticelas na superfície dos tubérculos e no tecido vascular da batata. A disseminação de *R. solanacearum* biovar 2 para praticamente todas as regiões do mundo está associada com tubérculos-semente de batata, nos quais populações latentes do patógeno podem colonizar os tecidos vasculares sem induzir sintomas da doença (Ciampi et al., 1980; Hayward, 1991). Recentemente, diversos surtos de murcha bacteriana na cultura da batata foram detectados em diferentes países da comunidade Européia (Elphinstone et al., 1998). A necessidade de assegurar medidas quarentenárias tem conduzido as pesquisas na busca de métodos sensíveis que sejam capazes de detectar o patógeno antes de iniciarem os sintomas visíveis, para diagnose ainda nos períodos de latência (Martins, 2000).

Em relação à biologia da doença, as infecções latentes têm sido o aspecto mais preocupante para os melhoristas na busca de cultivares resistentes. Esta característica é prejudicial por propiciar a disseminação do patógeno em um material aparentemente saudável. Em outras circunstâncias,

a cultivar pode ser suscetível, porém a doença não se manifesta devido a baixas temperaturas e os sintomas se expressam quando os tubérculos colhidos são incubados ou plantados sob temperaturas favoráveis à expressão da doença (Hayward, 1991).

Ciampi & Sequeira (1980) avaliaram populações latentes de *R. solanacearum* em cultivares de batata resistentes e suscetíveis e constataram diferenças na capacidade de suportar populações latentes do patógeno. Em hospedeiras alternativas, Elphinstone et al. (1998) verificaram, pelas técnicas de PCR, DAS-ELISA e meio de cultura seletivo, infecções latentes em mais de 15% das plantas amostradas de *Solanum dulcamara* submetidas à irrigação com água proveniente de lavouras de batata contaminadas com o patógeno.

Maciel (1999) avaliou populações de *R. solanacearum* em cultivares de batata com diferentes níveis de resistência à murcha bacteriana e concluiu que as cultivares Achat, Baronesa, Elvira, Macaca, Monte Bonito e Trapeira, com exceção da Baronesa, apresentaram a mesma capacidade de suportar populações latentes de *R. solanacearum* em plantas sem sintomas. Constatou, também, que para as plantas com sintomas de murcha, não houve relação entre a densidade populacional do patógeno e o grau de resistência das cultivares de batata. De acordo com Elphinstone (1994), a resistência a infecções latentes também está sob controle genético. Tubérculos sem sintomas e infecções nas hastes estão restritos a certos genótipos de *S. phureja* e as estirpes de *R. solanacearum* também diferem na habilidade de causar infecções latentes.

CAPÍTULO II

2. INCIDÊNCIA DAS BIOVARES 1 E 2 DE *Ralstonia solanacearum* EM LAVOURAS DE BATATA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

2.1. INTRODUÇÃO

A murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. 1995; sin. *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith é uma das maiores limitações ao cultivo da batata (*Solanum tuberosum* L.) em regiões de clima tropical, subtropical e zonas mais quentes de clima temperado em todo o mundo (Hayward, 1991; Hayward, 1995). *Ralstonia solanacearum* pode ser classificada por raças em relação à espécie hospedeira, e por biovars conforme a habilidade de digerir ou oxidar determinados açúcares e alcoóis (Buddenhagen et al., 1962; Hayward, 1964). Dois grupos de estirpes são capazes de infectar a cultura da batata. As estirpes da biovar 1 (raça 1), com grande número de hospedeiros, possuem maior capacidade de persistir no solo e predominam em regiões de clima quente e as estirpes da biovar 2 (raça 3), que infectam basicamente a batata em regiões de clima temperado e apresentam maior capacidade de produzir infecções latentes (Ciampi &

Sequeira, 1980; Ciampi et al., 1980; Hayward, 1991; Lopes, 1994; Takatsu & Lopes, 1997). As infecções latentes são de particular importância na cultura da batata e os tubérculos-semente infectados constituem a fonte de inóculo mais importante para a disseminação do patógeno (Hayward, 1991). O comportamento das estirpes destes dois grupos determina peso diferenciado nos aspectos considerados para o manejo integrado da doença, sendo que a melhor forma de se evitar o problema é assegurar-se de que o solo e os tubérculos-semente utilizados para plantio estejam livres do patógeno (Elphinstone & Aley, 1993; Lopes, 1994; Lopes & Takatsu, 1997). Nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil, estirpes da biovar 2 predominam, mas estirpes da biovar 1 também podem ser isoladas (Lopes et al. 1993; Mariano et al., 1998; Maciel, 1999). No Rio Grande do Sul (RS), onde o clima é subtropical úmido, a batata é cultivada em duas safras anuais, totalizando uma área superior a 48.000 ha, em pelo menos quatro regiões distintas, sendo *R. solanacearum* considerada endêmica (Ramos, 1998). De acordo com Martins & Couto (2001), deve-se considerar a prevalência das biovars 1 e 2 no RS.

Considerando a ausência de levantamentos com um número representativo de isolados de *R. solanacearum*, este estudo objetivou determinar as biovars prevalentes e sua distribuição em lavouras de batata do RS.

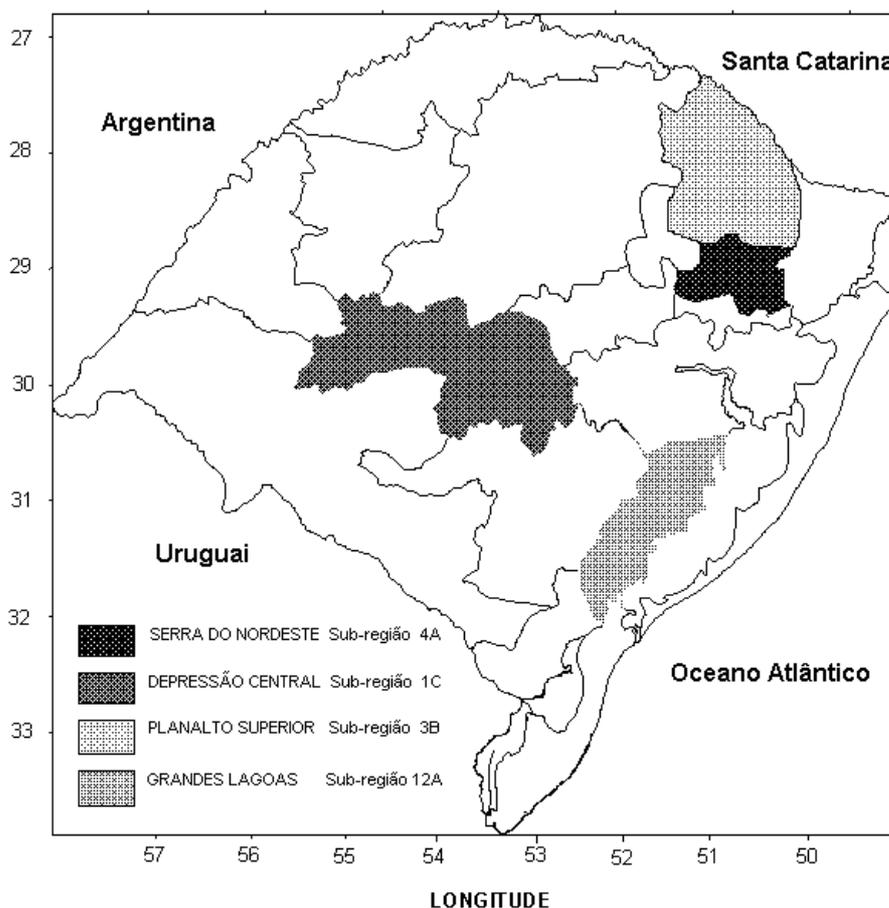
2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Obtenção das amostras e isolamento de *Ralstonia solanacearum*

Vinte plantas de batata, com sintomas de murcha bacteriana, foram coletadas nos meses de setembro a dezembro de 1999, em 25 lavouras localizadas em 10 municípios de quatro regiões: Depressão Central, Sub-região 1C (Santa Maria e Silveira Martins); Serra do Nordeste, Sub-região 4A (Carlos Barbosa, Farroupilha e Garibaldi); Planalto Superior, Sub-região 3B (Nova Prata, Ibiraiáras e São Jorge) e Grandes Lagoas, Sub-região 12A (Pelotas e São Lourenço) (Figura 1) (Rio Grande do Sul, 1994).

Hastes de plantas com sintomas foram desinfestadas através da imersão consecutiva em álcool 70% e hipoclorito de sódio 1%, por 30 s, e lavadas em água destilada esterilizada (ADE). Segmentos de 1 a 2 cm foram então colocados em tubos de centrífuga (1,5 ml) contendo 500 µl de ADE para coleta do fluxo bacteriano. A suspensão de células foi diluída em série (10X) por transferência para novos tubos com ADE. Vinte microlitros das diferentes diluições foram colocados e espalhados na superfície do meio de cultura SPA (sacarose, 20; peptona 5; K₂HPO₄ 0,5; MgSO₄ · 7 H₂O 0,25; Agar 15 g/l) pH 7,2, mais 0,05% de cloreto de trifenil tetrazólio (CTT) (2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride, Sigma) em placas de Petri. Colônias fluídas com centro vermelho e bordas brancas foram transferidas para novas placas e, após 48 h a 28 °C, submetidas aos testes de Gram, oxidase e DAS-ELISA, com anti-soro policlonal reativo à *R. solanacearum*, fornecido pela EMBRAPA-CPACT (Castro

et al., 1993). Os isolados obtidos foram armazenados em ADE à 5 °C e em glicerol-água (15:85) à -80 °C.



Fonte: Rio Grande do Sul, 1994.

FIGURA 1. Regiões agroecológicas do Estado do Rio Grande do Sul onde foram coletadas plantas de batata com sintomas de murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*, em lavouras de produção. Porto Alegre, RS, 2002.

2.2.2. Determinação da biovar

2.2.2.1. Testes bioquímicos

Culturas bacterianas, com 24 h de crescimento em meio SPA à 28 °C, foram transferidas, com um palito de dente previamente esterilizado, para a superfície de 150 µl de meio Ayers pH 7,2 (NH₄H₂PO₄, 1; KCl, 0,2;

MgSO₄.7H₂O, 0,2; agar, 6 g/l), acrescido de 1 ml/l de azul de bromotimol 1,6% e celobiose, ou lactose, ou maltose, ou trealose, ou dulcitol, ou manitol ou sorbitol, na concentração final de 1%, contido em cada um dos 96 orifícios de uma placa de microtitulação. O meio sem fonte de carbono serviu de controle negativo. Cada isolado foi cultivado em três placas diferentes com cada uma das fontes de carbono. Após sete dias à 28 °C, a capacidade do isolado oxidar a fonte de carbono foi considerada positiva quando a cor do meio mudou de verde para amarela (Schaad, 1988).

2.2.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase

Células de *R. solanacearum*, cultivadas em SPA por 24 h à 28 °C, foram transferidas com uma alça para 100 µl de ADE, contidos em tubos de centrifuga (1,5 ml). A suspensão foi mantida em banho-maria à 95-98 °C por 5 min e constituiu-se na amostra. A PCR foi feita em 25 µl de tampão (10 mM Tris-HCl [pH 8,3] a 25 °C, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,001% de gelatina [peso/vol], 0,05% de Nonidet P-40 [vol/vol], 0,05% de Tween 20 [vol/vol]), 0,2 mM de cada dNTP, 1,25 U de polimerase *AmpliTaq* (Gibco-BRL), 1 µM de oligonucleotídeos iniciadores e 3 µl da amostra. Utilizou-se os oligonucleotídeos iniciadores T3A (5'-GGG GGT TCG AAT TCC CCG CCG GCC CCA-3') e T5A (5'-AGT CCG GTG CTC TAA CCA ACT GAG-3') (Cybersyn), identificadores das biovars 1 e 2 (Welsh & McClelland, 1991; Seal et al., 1992). As amplificações foram conduzidas em termociclador MJ Research (Minicycler TM), nas seguintes condições: 96 °C, 2 min; (94 °C, 30 s; 50 °C, 15 s; 72 °C, 1 min) 35 vezes; 72 °C, 10 min. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose 2% (Gibco-BRL), submetidos à eletroforese à

4V/cm por 2 h, corados com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados com sistema computadorizado de análise de gel (Kodak Digital Science 1D).

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quatrocentos e noventa isolados de *R. solanacearum* foram obtidos nas quatro principais regiões produtoras de batata do RS. Os resultados dos testes de identificação da biovar estão relacionados por região produtora (Tabela 1).

Dos 490 isolados de *R. solanacearum*, 94% foram identificados como biovar 2 e os 6% restantes como biovar 1. A predominância de estirpes da biovar 2 no RS pode estar relacionada com as condições climáticas, principalmente de temperatura, que favoreçam as estirpes deste grupo. Estes resultados corroboram com a afirmação de que a biovar 2 é endêmica nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (French et al., 1993), onde predominam as menores temperaturas. Em um levantamento realizado no Estado do Paraná, Lopes et al. (1993) obtiveram 83 isolados de *R. solanacearum* de 15 campos de produção de batata em sete municípios. Setenta e nove isolados foram identificados como biovar 2 e quatro isolados, obtidos no município de Contenda, como biovar 1. Maciel (1999) obteve resultado semelhante ao determinar que 95% dos 77 isolados, obtidos em lavoura de batata no município de Caxias do Sul, RS, pertenciam à biovar 2, mas apenas no cultivo de primavera (setembro a janeiro), quando as temperaturas são mais elevadas, sendo que a presença da biovar 1 não foi detectada no cultivo de outono (fevereiro a junho). Este, no entanto, é o primeiro trabalho que envolve o levantamento de um número representativo de lavouras de diferentes regiões do RS.

TABELA 1 – Incidência das biovars 1 e 2 de *Ralstonia solanacearum* em lavouras de produção de batata de quatro regiões agroecológicas do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, 2002.

REGIÃO	MUNICÍPIO	NÚMERO DE ISOLADOS				
		LAVOURA			BIOVAR	
		1	2	3	1	2
SERRA DO NORDESTE (17,1 °C)*	CARLOS BARBOSA	20 ^{** (Sin)}	20 ^(Bar)	20 ^(Bar)	2	58
	FARROUPILHA	20 ^(Elv)	20 ^(Bar)	0	1	39
	GARIBALDI	20 ^(Sin f)	0	0	20	0
	(%)				19	81
PLANALTO SUPERIOR (19,0 °C)	IBIRAIÁRAS	20 ^(Elv)	20 ^(Bar)	20 ^(Mac)	0	60
	NOVA PRATA	20 ^(Bar)	20 ^(Ast)	20 ^(Bar)	0	60
	SÃO JORGE	20 ^(Bar)	20 ^(Bar)	20 ^(Bar)	0	60
	(%)				0	100
DEPRESSÃO CENTRAL (20,4 °C)	SANTA MARIA	20 ^(Bar)	20 ^(Bar)	20 ^(Mac)	0	60
	SILVEIRA MARTINS	20 ^(Elv)	20 ^(Mac)	10 ^(Mac)	5	45
	(%)				5	95
GRANDES LAGOAS (18,8 °C)	PELOTAS	20 ^(Mac)	0	0	0	20
	SÃO LOURENÇO DO SUL	20 ^(Mac)	20 ^(Sin)	20 ^(San)	0	60
	(%)				0	100
TOTAL			490		28	462
					6 %	94 %

* Temperatura média de setembro a dezembro de 1999 (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio Grande do Sul-FEPAGRO).

** Cultivar plantada nas lavouras amostradas: Ast = Asterix; Bar = Baronesa; Elv = Elvira; Mac = Macaca; San = Santo Amor; Sin = Sinfonia.

A utilização de trealose, meso-inositol, D-ribose, atividade pectolítica e redução de nitrato revelaram a existência de dois novos fenótipos entre estirpes da biovar 2 (Hayward, 1994). Estes diferem do padrão para biovar 2 pela oxidação de trealose, sendo um deles bastante homogêneo

geneticamente, caracterizado também como biovar 2 (raça 3) e de ocorrência na Colômbia e Chile. O outro fenótipo, relacionado como biovar 2T, é geneticamente mais heterogêneo e oxida D-ribose além de trealose (Hayward, 1994).

A determinação de biovars utilizando os açúcares celobiose, lactose e maltose e os alcoóis dulcitol, manitol e sorbitol, como proposto inicialmente (Hayward, 1964), bem como a amplificação de DNA com os oligonucleotídeos iniciadores T3A e T5A (Seal et al., 1992) não identificam estas variantes.

A biovar 2T (ou N2), uma variante de biovar 2 relacionada a regiões de clima tropical de baixa altitude, com centro de origem na Região Amazônica, é composta por grupos de RFLP diferentes da biovar 2 (Gillings & Fahy, 1993). French et al. (1993) identificaram 23 estirpes como biovar 2, entre isolados obtidos nos Estados de Minas Gerais e São Paulo e no Distrito Federal. Destes, nove pertenciam a biovar 2T, indicando que o mesmo pode não estar restrito a sua região de origem.

Dentre os demais testes bioquímicos, para um determinado isolado ser caracterizado como biovar 2T é necessário que o mesmo oxide trealose e amplifique apenas um segmento de DNA de 100 pb com os oligonucleotídeos iniciadores T3A e T5A, o que não foi constatado entre as estirpes estudadas.

A biovar 1 ocorreu na cultivar Sinfonia, em Garibaldi e na cultivar Macaca, em Silveira Martins. Em Garibaldi, 20 isolados obtidos de uma única lavoura foram identificados como biovar 1, o que elevou o percentual de isolados desta biovar para 19% na região da Serra do Nordeste. A temperatura média naquela região no período foi 17,1 °C, menor do que nas demais (Tabela 1), indicando que outros fatores foram responsáveis pela alta incidência

naquele local. A temperatura é um dos principais fatores que afeta a ocorrência das biovars de *R. solanacearum*, sendo que a biovar 1 é favorecida por temperaturas entre 26 e 36 °C (Hayward, 1991). No entanto, a constante introdução de estirpes desta biovar através de batata-semente e o conseqüente aumento da população no solo poderiam explicar a maior incidência apesar da menor temperatura. Assim sendo, um trabalho de detecção de biovars de *R. solanacearum* em batata-semente utilizada no RS poderia esclarecer a razão da incidência, particularmente da biovar 1, em locais menos propícios.

As áreas de produção de batata para consumo no RS são de um modo geral cultivadas de modo intensivo, nem sempre observando uma rotação de culturas adequada, pela falta de opções de cultivo com outras espécies que possibilitem um retorno econômico, ou pela escassez de novas áreas disponíveis nas regiões tradicionais de cultivo de batata (Ramos, 1998). A não utilização de batata-semente certificada por parte dos produtores de batata para consumo, bem como a introdução de novas cultivares produzidas em outras regiões do país ou mesmo pela importação, podem contribuir para a introdução do patógeno. Mesmo em áreas de certificação de batata no Brasil, a MB tem sido responsável pela condenação de 8,8% da área plantada, o equivalente a 64,1% das condenações (Lopes et al., 1990).

A sobrevivência de *R. solanacearum* em áreas infestadas pode estar relacionada a sua adaptação em colonizar raízes de plantas como rizobactérias, sendo a patogenicidade uma exceção à regra, que acontece em condições edafoclimáticas especiais (Crosse, 1967; Mello, 1995, citados por

Takatsu & Lopes, 1997). Deste modo, a maioria das plantas hospedeiras pode ser assintomática ou não suscetível e atuar como melhor mantenedoras do patógeno do que as plantas suscetíveis (Takatsu & Lopes, 1997).

O tipo de solo parece não ter relação com as estirpes de diferentes biovars de *R. solanacearum*. Abdullah (1993) procurou relacionar a ocorrência de *R. solanacearum* e sua distribuição geográfica na Malásia. Constatou a presença de diferentes estirpes do patógeno em solos com composição a base de areia, argila, silte e turfa e também com diferentes teores de matéria orgânica ou pH. Não encontrou relação entre a ocorrência das diferentes biovars e o tipo de solo, mas sim com a altitude local, fortemente influenciada pela temperatura.

Estirpes de *R. solanacearum* diferem na gama de hospedeiras, distribuição geográfica, patogenicidade, relacionamento epidemiológico e propriedades fisiológicas, de modo que as classificações em nível infra-específico de biovar e raça, embora não previstas pelo Código de Nomenclatura de Bactérias, auxiliam com informações de valor previsível nos contextos epidemiológicos e de controle da MB (Hayward, 1991). As biovars 1 e 2, que infectam a batata, são bastante distintas das demais biovars em todos os aspectos relacionados.

Embora o primeiro relato de MB tenha ocorrido na Suécia em 1976 (Olson, 1976), o registro da biovar 2 ameaçando a produção de batata, particularmente batata-semente, só foi registrada na Europa no início da década de 90 (Elphinstone et al., 1996). A erradicação tem sido a estratégia utilizada. No Canadá e E.U.A., a tolerância à doença é zero e esta não tem sido registrada a

campo. Assim, a ocorrência endêmica e predominante da biovar 2 no RS facilita a condução de pesquisas de campo com interesse internacional.

CAPÍTULO III

3. CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Ralstonia solanacearum*, ISOLADAS DE PLANTAS DE BATATA COM MURCHA BACTERIANA NO RIO GRANDE DO SUL, POR PCR-rep E RAPD

3.1. INTRODUÇÃO

Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi et al. 1995 (sin. *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith) é uma espécie complexa com significativa diversidade genética (Martins, 2000). Possui um número extensivamente grande de espécies hospedeiras abrangendo mais de 50 famílias botânicas. Nenhuma outra espécie de bactéria fitopatogênica, à exceção de *Agrobacterium tumefaciens*, infecta tamanha diversidade de hospedeiras quanto *R. solanacearum* (Hayward, 1995). Para caracterizar esta variabilidade intra-específica, utiliza-se um sistema de classificação binário de raças e biovars, embora este não faça parte dos critérios do Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias (Buddenhagen et al., 1962; Hayward, 1964; Hayward, 1991). *R. solanacearum* pode ser classificada em cinco raças com base nas espécies hospedeiras e em cinco biovars de acordo com a capacidade de utilizar diferentes açúcares e alcoóis (He et al., 1983; Hayward, 1994).

Tradicionalmente considerado como um dos mais sérios patógenos da batata em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, *R. solanacearum* tem aumentado sua importância após os recentes surtos registrados na Europa (Elphinstone et al., 1996, 1998). De acordo com Van Der Wolf et al. (1998), estudos epidemiológicos visando medidas de controle dependem do conhecimento da variabilidade genética da população do patógeno.

A utilização de cultivares resistentes é a alternativa mais simples e efetiva para o controle da murcha bacteriana (Hayward, 1991). No entanto, a resistência genética não tem demonstrado estabilidade em relação ao tempo e ao local, devido às alterações climáticas nas diferentes regiões geográficas e a variabilidade genética das estirpes do patógeno (Grimault et al., 1994). Um maior conhecimento da genética populacional de *R. solanacearum* poderia auxiliar na compreensão da resistência específica a determinados locais (Jaunet & Wang, 1998).

Técnicas moleculares têm permitido o estudo do relacionamento filogenético e evolucionário de *R. solanacearum*, bem como o de variabilidade em nível intra-específico. Com base em análises de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), Cook et al. (1989) e Gillings & Fahy (1993) definiram 33 grupos ou genótipos de *R. solanacearum*. Os coeficientes de similaridade gerados entre os grupos revelaram duas divisões distintas, que refletem provavelmente um relacionamento filogenético ou evolucionário, sendo a origem geográfica das estirpes a característica mais fortemente correlacionada. Pesquisas posteriores têm confirmado os resultados prévios de Cook et al. (1989). Seal et al. (1992) realizaram a amplificação do DNA de 112 estirpes de *R. solanacearum* por PCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores

T3A e T5A de tRNA. Baseado no perfil genético a divisão da espécie em três grupos foi proposta e corresponde à divisão previamente obtida por RFLP.

De acordo com Smith et al. (1995), poucos estudos têm sido realizados visando caracterizar a variabilidade genética de *R. solanacearum*, sendo que o delineamento de populações bacterianas é um pré-requisito para o estudo de epidemiologia de patógenos e essencial para o desenvolvimento de estratégias de controle. A diversidade genética de *R. solanacearum*, verificada por PCR-rep, tem sido avaliada relacionando o perfil genético com a biovar ou raça e a origem geográfica das estirpes (Fegan et al., 1998; Smith et al., 1998; Van der Wolf et al., 1998; Martins, 2000; Horita & Tsuchiya, 2001). Esta técnica baseia-se na capacidade de amplificação de segmentos de DNA entre seqüências repetitivas que ocupam regiões intergênicas dispersas no cromossomo de procaríotos e são referidas como REP (Repetitive Extragenic Palindromic) (Stern et al., 1984), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) (Hulton et al., 1991) e BOX (Martin et al., 1992). A técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), que emprega oligonucleotídeos iniciadores aleatórios, também tem sido utilizada visando determinar variabilidade em estirpes de *R. solanacearum* (Jaunet & Wang, 1998; Thwaites et al., 1999).

No Estado do Rio Grande do Sul (RS), Maciel et al. (2001) constataram a presença das biovars 1 e 2 de *R. solanacearum* em uma mesma área de cultivo de batata, com predominância da biovar 2. Trabalhos de caracterização da variabilidade genética de isolados obtidos no RS, têm sido realizados com PCR-rep (Martins, 2000; Martins & Couto, 2001).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar isolados de *R. solanacearum* biovar 1 e 2 provenientes de quatro regiões produtoras de batata no RS utilizando marcadores PCR-ERIC, BOX e RAPD.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados utilizados neste estudo estão listados na Tabela 1 e foram obtidos de plantas de batata com sintomas de murcha bacteriana, coletadas nos meses de setembro a dezembro de 1999, em 25 lavouras localizadas em 10 municípios de quatro regiões produtoras do RS: Depressão Central (Santa Maria e Silveira Martins); Serra do Nordeste (Carlos Barbosa, Farroupilha e Garibaldi); Planalto Superior (Nova Prata, Ibiraiáras e São Jorge) e Grandes Lagoas (Pelotas e São Lourenço).

O isolamento foi realizado através da coleta do fluxo bacteriano em tubos de centrifuga (1,5 ml) contendo 500 µl de água destilada esterilizada (ADE), a partir de segmentos de hastes (1 a 2 cm), previamente desinfestados através da imersão consecutiva em álcool 70% e hipoclorito de sódio 1%, por 30 s e lavadas em ADE. A suspensão de células foi diluída em série (10X) por transferência para novos tubos com ADE e 20 µl das diferentes diluições foram espalhados por esgotamento na superfície do meio de cultura SPA (sacarose, 20; peptona, 5; K₂HPO₄, 0,5; MgSO₄. 7 H₂O, 0,25; agar 15 g/l) pH 7,2, mais 0,05% cloreto de trifetil tetrazólio (CTT) (2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride, Sigma) em placas de Petri. Colônias fluídas com centro vermelho e bordas brancas foram transferidas para novas placas e, após 48 h à 28 °C, submetidas aos testes de Gram, oxidase e DAS-ELISA, com anti-soro policlonal reativo a *R. solanacearum* fornecido pelo Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (EMBRAPA-CPACT) (Castro et al., 1993). Os isolados obtidos, um

por planta, foram então submetidos a testes bioquímicos para determinação da biovar, de acordo com a capacidade em oxidar as fontes de carbono:

TABELA 1 – Biovares de *Ralstonia solanacearum* obtidos de plantas de batata de lavouras das diferentes regiões produtoras do RS e avaliados por PCR-ERIC, BOX e RAPD. Porto Alegre, RS, 2002.

Sub Região	Município	Isolado*	Biovar	Cultivar de Batata
Serra do Nordeste	Carlos Barbosa	CB12	2	Sinfonia
		CB15	2	Sinfonia
		CB110	2	Sinfonia
		CB112	1	Sinfonia
		CB116	1	Sinfonia
		CB23	2	Baronesa
		CB25	2	Baronesa
		CB27	2	Baronesa
		CB32	2	Baronesa
		CB33	2	Baronesa
	CB38	2	Baronesa	
	Farroupilha	FA13	2	Elvira
		FA15	2	Elvira
		FA17	2	Elvira
		FA118	1	Elvira
		FA21	2	Baronesa
		FA22	2	Baronesa
		FA210	2	Baronesa
	Garibaldi	GA11	1	Sinfonia
		GA17	1	Sinfonia
		GA112	1	Sinfonia
		GA118	1	Sinfonia
		GA119	1	Sinfonia
Planalto Superior	Ibiraíaras	IB12	2	Elvira
		IB16	2	Elvira
		IB18	2	Elvira
		IB24	2	Baronesa
		IB27	2	Baronesa
		IB29	2	Baronesa
		IB31	2	Macaca
		IB32	2	Macaca
		IB34	2	Macaca
		Nova Prata	NP13	2
	NP16		2	Baronesa
	NP19		2	Baronesa
	NP23		2	Asterix
	NP210		2	Asterix
	NP211		2	Asterix
	NP32		2	Baronesa
	NP35	2	Baronesa	
	NP37	2	Baronesa	
	São Jorge	SJ15	2	Baronesa
		SJ16	2	Baronesa
		SJ19	2	Baronesa

SJ26	2	Baronesa
SJ212	2	Baronesa
SJ215	2	Baronesa
SJ35	2	Baronesa
SJ36	2	Baronesa
SJ317	2	Baronesa

Continuação

TABELA 1 – Biovares de *Ralstonia solanacearum* obtidos de plantas de batata de lavouras das diferentes regiões produtoras do RS e avaliados por PCR-ERIC, BOX e RAPD. Porto Alegre, RS, 2002.

Sub Região	Município	Isolado*	Biovar	Cultivar de batata
Depressão Central	Santa Maria	ST11	2	Baronesa
		ST113	2	Baronesa
		ST119	2	Baronesa
		ST21	2	Baronesa
		ST218	2	Baronesa
		ST219	2	Baronesa
		ST33	2	Macaca
		ST35	2	Macaca
		ST38	2	Macaca
		Silveira Martins	SM11	2
	SM13		2	Elvira
	SM19		2	Elvira
	SM22		2	Macaca
	SM25		2	Macaca
	SM28		2	Macaca
	SM31		2	Macaca
	SM33		1	Macaca
	SM35		2	Macaca
	SM36		1	Macaca
	Grandes Lagoas	Pelotas	PE11	2
PE12			2	Macaca
PE18			2	Macaca
São Lourenço do Sul		SL14	2	Macaca
		SL16	2	Macaca
		SL18	2	Macaca
		SL24	2	Sinfonia
		SL26	2	Sinfonia
		SL217	2	Sinfonia
		SL34	2	SantoAmor
		SL35	2	SantoAmor
		SL37	2	SantoAmor

* Um isolado por planta

celobiose, lactose, maltose, trealose, dulcitol, manitol e sorbitol, conforme Schaad (1988). Os isolados foram armazenados em ADE a 5 °C e em glicerol-água (15:85) à -80 °C.

Os isolados de referência para as biovars 1 e 2 de *R. solanacearum* utilizados neste estudo foram fornecidos pela EMBRAPA-CPACT: RS6, RS7 e RS45 (biovar 2), e RS25 e RS26 (biovar 1), e pelo Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (EMBRAPA-CNPQ): RS44 (biovar 2), e RS72, RS116 e RS127 (biovar 1). Todos os isolados fornecidos são oriundos de plantas de batata e caracterizados nos respectivos centros de pesquisa.

3.2.1. Extração do DNA

A extração do DNA de *R. solanacearum* foi realizada de acordo com Boucher et al. (1987). Os isolados foram cultivados em 5 ml de meio líquido de mesma composição do SPA, sob agitação à 28 °C por 24 h. A suspensão foi transferida para microtubos e centrifugada a 13.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado, o precipitado lavado com 1 ml de tampão TE8 pH 8,0 (50 mM Tris; 20 mM EDTA), ressuspenso em 540 µl de tampão TE8 e incubado a 70 °C por 15 min. A seguir, acrescentou-se 1,5 µl de proteinase K (10 mg/ml) e 30 µl de sarkosil (10%) e incubou-se a 50 °C por 15 h. Após, 540 µl de fenol/clorofórmio (50:50 v/v) foram acrescentados e a suspensão agitada vigorosamente por 1 min, centrifugada a 13.000 rpm por 15 min e o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para outro microtubo. Acrescentou-se 540 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1 v/v) e a mistura agitada vigorosamente por 1 min e centrifugada novamente a 13.000 rpm por 15 min. O sobrenadante contendo o DNA foi então transferido para um novo

microtubo e o DNA precipitado com 1 ml de etanol 100% e incubado a -20 °C por 2 h. Após o período de incubação, a amostra foi centrifugada a 13.000 rpm por 15 min, o sobrenadante descartado e o DNA lavado com 500 µl de etanol 70%, seco e suspenso em 200 µl de água ultra-pura. As quantificações foram realizadas em espectrofotômetro (Beckman DU 65) e o DNA mantido a -20 °C.

3.2.2. PCR-BOX, ERIC e RAPD

A variabilidade genética dos isolados de *R. solanacearum* foi avaliada para as seqüências repetitivas ERIC e BOX, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores sintetizados pela Annovis (Inc., Aston PA, E.U.A.) ERIC1R (5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3') e ERIC2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3') Versalovic et al., 1991), e BOXA1R (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') (Versalovic et al., 1994).

PCR ERIC e BOX foram realizadas em um volume final de 25 µl, contendo tampão (10 mM Tris-HCl [pH 8,3] a 25 °C, 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂ (BOX), 2 mM MgCl₂ (ERIC); 0,2 mM dNTPs, 1,25 U Polimerase Ampli Taq (Gibco-BRL), 1 µM oligonucleotídeos iniciadores e 60 ng de DNA.

As amplificações foram conduzidas em termociclador MJ Research (Minicycler TM), nas seguintes condições: 95 °C, 5 min; (94 °C, 1 min; 51 °C (BOX) e 53 °C (ERIC), 1 min; 65 °C, 8 min) 30 vezes e 65 °C 15 min. A PCR foi repetida para todos os isolados.

A PCR-RAPD foi realizada com o conjunto OPO de oligonucleotídeos iniciadores, sintetizados pela Operon Technologies (Alameda,U.S.A) OPO-02 (5'-ACG TAG CGT C-3'), OPO-04 (5'-AAG TCC GCTC-3'), OPO-10 (5'-TCA GAG CGC C-3') e OPO-12 (5'-CAG TGC TGT G-3') (Welsh & McClelland,

1990). As reações foram realizadas em um volume final de 25 µl, contendo tampão (10 mM Tris-HCl [pH 8,3] a 25 °C, 50 mM KCl), 2 mM MgCl₂; 0,001% de gelatina, 0,2 mM dNTPs, 1,25 U Polimerase Ampli *Taq* (Gibco-BRL), 10 pM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, e 60 ng de DNA. As amplificações foram conduzidas em termociclador MJ Research (Minicycler TM), nas seguintes condições: 94 °C, 5 min; (94 °C, 1 min; 38 °C, 1 min; 72 °C, 2 min) 40 vezes e 72 °C 10 min.

Os produtos resultantes da amplificação da PCR-RAPD, ERIC e BOX foram separados em gel de agarose 1,4% (Gibco-BRL), juntamente com um padrão de DNA 1Kb Ladder (Gibco-BRL), submetidos à eletroforese 4 v/cm por 4 h, corados com brometo de etídeo, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados com sistema de fotodocumentação computadorizado de análise de gel (Kodak Digital Science 1D – EDAS 120).

3.2.3. Análise de agrupamento

O produto resultante da amplificação por PCR foi analisado pelo sistema de fotodocumentação (EDAS) ajustando o nível de captura de imagem para 50%. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SSPS (Wilkinson et al., 1992), onde foi determinada a matriz de similaridades genéticas e construído o dendrograma das distâncias genéticas entre as estirpes testadas. De acordo com Judd et al (1993), a análise de dados combinados é particularmente usada para determinação do relacionamento genético entre os organismos. O número de fragmentos foi determinado e a presença ou ausência de determinado fragmento foi considerada e codificada como 1 ou zero, respectivamente. A matriz de similaridade genética entre os isolados foi

construída utilizando o coeficiente de simples associação e os agrupamentos feitos de acordo com o método UPGMA (Unweight Pair Group Method with Arithmetic Average) (Crisci & Armengol, 1983).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amplificação por PCR do DNA das estirpes de *Ralstonia solanacearum* obtidos em áreas de produção de batata no RS, utilizando oligonucleotídeos iniciadores para seqüências ERIC e BOX, produziu múltiplos produtos com tamanho variando de 200 pb a 3 Kb, resultando em perfis genéticos distintos e úteis para a caracterização (Figuras 1 e 2).

PCR-BOX produziu um número superior de fragmentos amplificados, quando comparado com ERIC, mas ambos puderam diferenciar claramente os isolados das biovars 1 e 2.

A análise dos resultados da PCR-ERIC não indicou diferença entre os isolados da biovar 1 coletados em lavouras do RS dos isolados de referência (Figura 1). Comportamento diferente foi verificado com PCR-BOX, onde os isolados da biovar 1 de Garibaldi puderam ser diferenciados dos isolados de Silveira Martins, bem como dos isolados de referência, demonstrando maior capacidade de revelar polimorfismo (Figura 2).

A análise dos perfis genéticos dos isolados da biovar 2 mostrou menor variação, provavelmente pelo menor número de fragmentos. Estes perfis também foram menos reproduzíveis tanto com ERIC quanto com BOX (Figuras 1 e 2). Resultados semelhantes foram relatados por Smith et al. (1995) e Van Der Wolf et al. (1998). Segundo Van Der Wolf et al. (1998), o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores ERIC e BOX pode diferenciar isolados de diferentes biovars, porém foram incapazes de diferenciar isolados da biovar 2 (raça 3), devido à inconstância na reprodução dos segmentos polimórficos.

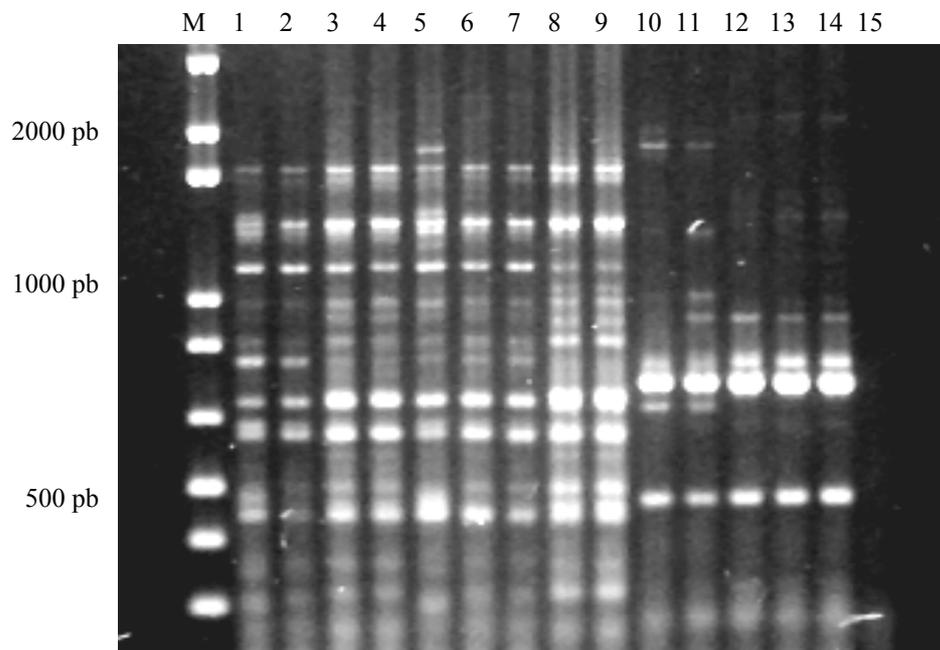


FIGURA 1 - Produto da amplificação do DNA de isolados de *Ralstonia solanacearum* por PCR-ERIC. (M) Marcador de peso molecular 1 Kb, (1) Isolado CB12, (2) CB15, (3) IB12, (4) IB18, (5) SL14, (6) SL16, (7) NP23, (8) NP35, (9) isolado de referência RS45, (10) GA11, (11) GA17, (12) SM37, (13) SM316, (14) Isolado de referência RS72, (15) água. Porto Alegre, RS, 2002.

Gillings & Fahy (1993) definiram por análises de RFLP, 33 grupos ou genótipos de *R. solanacearum*. Os isolados da biovar 2, com centro de origem na região Andina Ocidental, foram incorporados a apenas dois grupos RFLP (26 e 27), bastante homogêneos e geneticamente muito próximos, enquanto que os isolados da biovar 1 foram dispostos em seis grupos RFLP geneticamente mais heterogêneos. De acordo com Smith et al. (1998), há uma correlação entre a variabilidade genética e o número de espécies hospedeiras. Para *R. solanacearum* biovar 2 as espécies hospedeiras se restringem quase que exclusivamente à batata e em menor extensão ao tomateiro, enquanto que a biovar 1 apresenta uma diversidade de espécies hospedeiras.

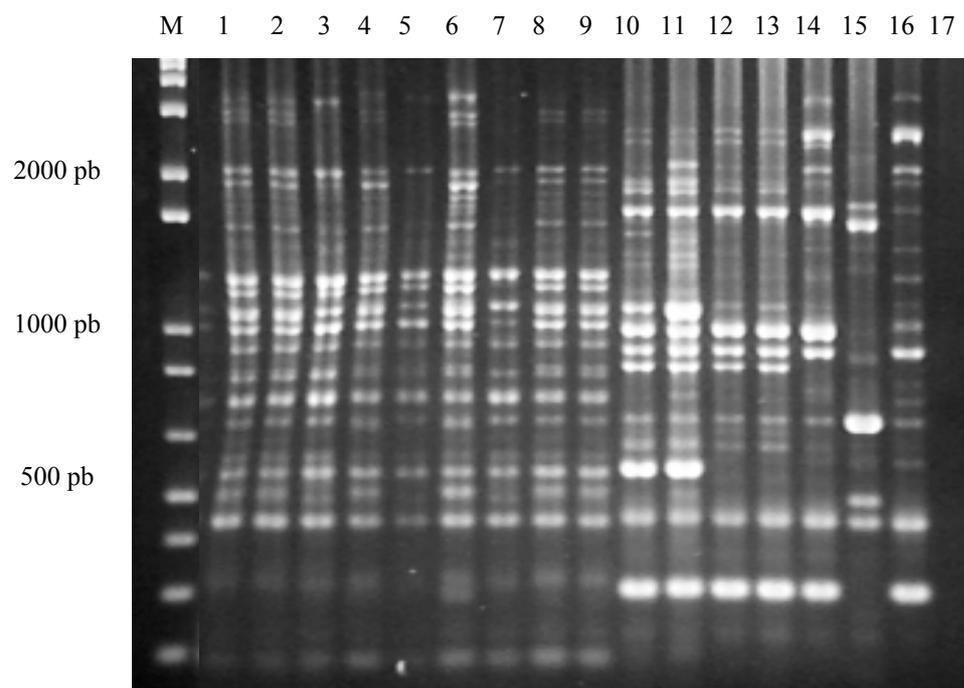


FIGURA 2 - Produto da amplificação do DNA de isolados de *Ralstonia solanacearum* por PCR-BOX. (M) Marcador de peso molecular 1 Kb, (1) Isolado FA13, (2) FA15, (3) ST33, (4) ST35, (5) PE11, (6) PE18, (7) SJ15, (8) SJ23, (9) isolado de referência RS45, (10) GA11, (11) GA17, (12) SM37, (13) SM316, (14) Isolado de referência RS127, (15) RS72, (16) RS116, (17) água. Porto Alegre, RS, 2002.

A variabilidade entre isolados da biovar 2 tem sido melhor determinada por PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis). Smith et al. (1995) determinaram 10 distintas linhas clonais entre 45 isolados da biovar 2, obtidos em áreas de produção de batata no Quênia por PFGE. De acordo com Van Der Wolf et al. (1998), os recentes surtos de murcha bacteriana registrados na Europa tornaram necessário o conhecimento da variação na população do patógeno, como base para estudos epidemiológicos visando medidas de controle. Embora os autores não obtivessem êxito com PCR-BOX e ERIC, a diversidade encontrada com AFLP e PFGE, este último utilizando enzima de restrição *Xba*I,

permitiu separar as estirpes da biovar 2 (raça 3) em diversos grupos, indicando a presença de diferentes linhas clonais na Europa. Mesmo para isolados das biovars 1 e 3 (raça 1), que apresentam maior variabilidade, trabalhos como o de Frey et al. (1996) confirmam que a técnica de PFGE é mais discriminatória do que PCR-rep.

Trabalhos biogeográficos com PCR-rep indicam que, na América do Sul, as estirpes de *R. solanacearum* biovar 2A compreendem três linhas clonais, uma no Peru, outra na Colômbia e Chile e uma terceira nos demais países da América do Sul (Smith et al., 1998). A biovar 2T, com centro de origem na região Amazônica, está relacionada a regiões de clima tropical de baixa altitude, possui um grande número de espécies hospedeiras e não é equivalente a biovar 2 (raça 3) (Horita & Tsuchiya, 2001). Apesar de sua aparência fenotípica bastante homogênea, é composta pelos grupos RFLP de 29 a 32, que são geneticamente heterogêneos (Gillings & Fahy, 1993).

A amplificação do DNA por RAPD das estirpes de *R. solanacearum* a partir de oligonucleotídeos iniciadores OPO-10 produziu múltiplos produtos, com tamanho variando de 200 pb a 3 KB (Figura 3). Os demais oligonucleotídeos iniciadores OPO-2, OPO-4 e OPO-12 produziram um número limitado de fragmentos e não foram avaliados.

O padrão de eletroforese do DNA dos isolados demonstrou que os mesmos apresentam um perfil de amplificação característico, relacionado com a região da qual os isolados foram obtidos, apresentando pouca variabilidade para o mesmo local (Figura 4). A análise de agrupamento com os dados obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores OPO-10 separou as estirpes das

biovares 1 e 2 em dois grupos distintos e a similaridade entre as estirpes de *R. solanacearum* foi bastante elevada, superior a 85% para RAPD (Apêndice 1).

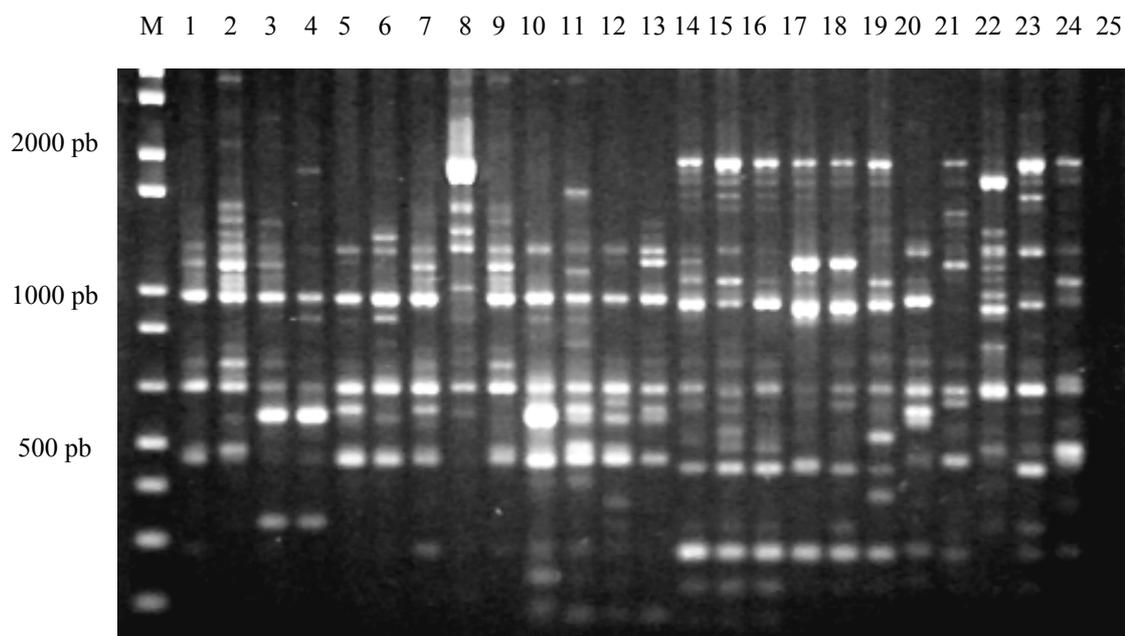


FIGURA 3 - Produto da amplificação do DNA de isolados de *Ralstonia solanacearum* por PCR-RAPD. (M) Marcador de peso molecular 1 Kb, (1) Isolado PE12, (2) PE18, (3) ST218, (4) ST219, (5) SL16, (6) SL18, (7) NP16, (8) NP35, (9) NP19, (10) IB12, (11) IB27, (12) SJ15, (13) SJ35, (14) SM317, (15) SM316, (16) M319, (17) GA11, (18) GA17, (19) CB112, (20) Isolado de referência RS6, (21) RS26, (22) RS72, (23) RS127, (24) RS116, (25) água. Porto Alegre, RS, 2002.

Trabalhos, utilizando marcadores moleculares RAPD, têm sido realizados visando melhoramento genético para resistência à *R. solanacearum* em batata (Gao et al., 2000; Fock et al., 2000) e tomate (Yui et al., 1999), bem como para detecção de *R. solanacearum* (Salava et al., 1998; Lee & Wang, 2000).

A utilidade de RAPD para determinação de diversidade genética de *R. solanacearum* também tem sido demonstrada (Jaunet & Wang, 1998; Thwaites et al., 1999). Ito et al. (1996) investigaram a variabilidade genética de isolados de nove diferentes áreas agrícolas do Japão por RAPD e análise de restrição e concluíram que a população de *R. solanacearum* consistia de um número independente de linhas clonais, sendo as mesmas relacionadas à região de origem. Do mesmo modo, Jaunet et al. (1996) verificaram elevada variabilidade entre isolados obtidos de viveiros de produção de mudas e de campos de produção de tomate em Taiwan. De acordo com Jaunet & Wang (1998), o método RAPD relevou a diversidade genética da população de *R. solanacearum* biovars 3 e 4 dos campos de produção de tomate, em um nível muito mais elevado do que os determinados por PFGE em isolados da biovar 2 (raça 3) por Smith et al. (1995) e de isolados das biovars 1 e 3 (raça 1) por Frey et al. (1996).

No presente trabalho a similaridade entre os isolados foi bastante elevada. No entanto, os oligonucleotídeos iniciadores utilizados por Jaunet & Wang (1998), OPAD1, OPAG6, OPAG14 e OPAE1, foram selecionados, segundo os autores, devido a sua capacidade em revelar polimorfismo entre isolados das biovars 3 e 4 de diferentes países asiáticos. Portanto, a capacidade do método RAPD em detectar polimorfismo depende, também, da escolha de oligonucleotídeos iniciadores que possibilitem revelar maior variabilidade entre os isolados da biovar em estudo.

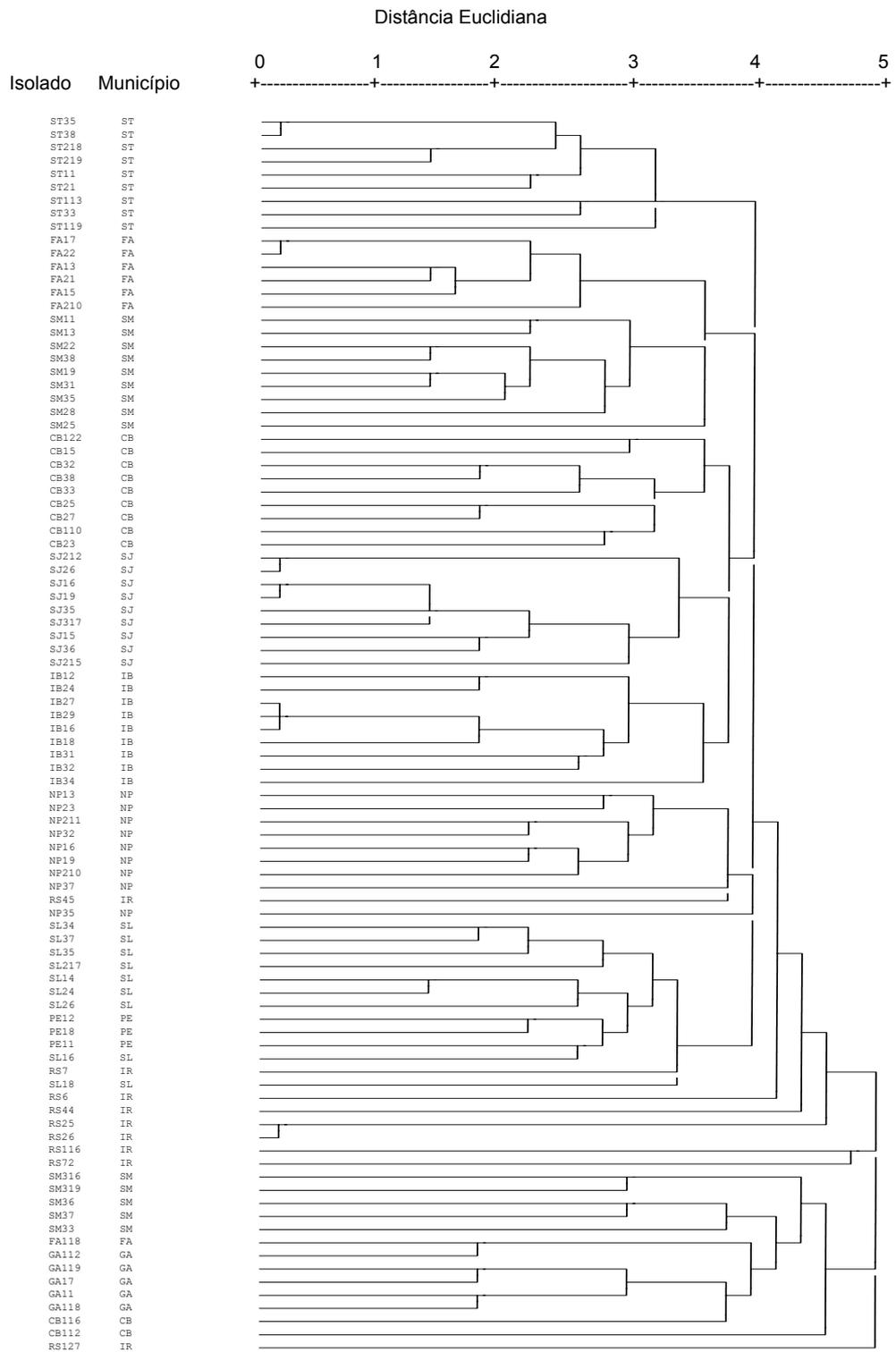


FIGURA 4 – Dendrograma baseado no método UPGMA, de acordo com perfis de amplificação gerado por PCR-RAPD dos isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos de lavouras de produção de batata no Estado do Rio Grande do Sul. ST (Santa Maria), FA (Farroupilha), SM (Silveira Martins), CB (Carlos Barbosa), SJ (São Jorge), IB (Ibiraiáras), NP (Nova Prata), SL (São Lourenço), PE (Pelotas), GA (Garibaldi), IR (isolado de referência). Porto Alegre, RS, 2002.

CAPÍTULO IV

4. PROGRESSO DA MURCHA BACTERIANA EM CULTIVARES E CLONES DE BATATA A CAMPO E PRESENÇA DE *Ralstonia solanacearum* EM TUBÉRCULOS ORIUNDOS DE PLANTAS ASSINTOMÁTICAS

4.1. INTRODUÇÃO

Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi et al. 1995; sin. *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith pode infectar diversas espécies de plantas de mais de 50 famílias botânicas, principalmente solanáceas (Hayward, 1995). Para a cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.), *R. solanacearum* é considerada uma das maiores limitações ao seu cultivo em regiões de clima tropical, subtropical e zonas mais quentes de clima temperado em todo o mundo (Hayward, 1991). Devido à grande variabilidade das estirpes bacterianas, *R. solanacearum* tem sido classificada em raças de acordo com a espécie hospedeira e em biovares de acordo com a habilidade de digerir ou oxidar diferentes fontes de carbono (Hayward, 1991). As estirpes que, sob condições naturais, infectam a batata são classificadas como biovar 1 (raça 1), ocasionam doenças basicamente de solo, ocorrem em clima mais quentes (26 a 36 °C) e possuem uma maior relação de espécies hospedeiras cultivadas e nativas. As estirpes da biovar 2 (raça 3), que ocorrem em regiões mais frias (15 a 20 °C), possuem maior capacidade de produzir infecções latentes nos

tubérculos e apresentam uma restrita relação de hospedeiros, sendo a batata o principal (Hayward, 1991; Lopes, 1994). As infecções latentes são de particular importância na cultura da batata. De acordo com Hayward (1991), os tubérculos-semente infectados constituem a fonte de inóculo mais importante para a disseminação do patógeno. A disseminação de *R. solanacearum* biovar 2, em nível mundial, está associada com tubérculos-semente de batata, nos quais populações latentes do patógeno podem colonizar os tecidos vasculares sem induzir sintomas da doença (Ciampi et al., 1980; Hayward, 1991).

Dentre as estratégias para controle de *R. solanacearum*, a utilização de cultivares resistentes é considerada a mais importante (Hayward, 1991). Entretanto, a resistência genética tem demonstrado instabilidade em virtude da variabilidade das estirpes do patógeno nos diferentes locais e por alterações do ambiente, principalmente de temperatura nas diferentes regiões climáticas. Em locais onde as temperaturas são mais elevadas, a resistência pode ser superada por estirpes específicas do patógeno (Rowe & Sequeira, 1970; Tung, 1990). Uma resistência específica a determinadas estirpes e instável em relação ao ambiente pode favorecer a disseminação do patógeno por tubérculos sem sintomas (Ciampi et al., 1980).

Em batata, a maioria das fontes de resistência à murcha bacteriana é originada de clones de *S. phureja*, uma espécie cultivada diplóide (French et al., 1998). Programas de melhoramento estão sendo implementados com genes de resistência de outras espécies diplóides do gênero *Solanum*, entre estas *S. sparsipilum*, *S. chacoense*, *S. microdontum* e *S. raphanifolium*, com vistas a ampliar a base genética para resistência (Elphinstone, 1994). O Centro Nacional de Pesquisas de Hortaliças (EMBRAPA-CNPH), em trabalho conjunto

com o Centro Internacional de la Papa (CIP), está selecionando genótipos para resistência à murcha bacteriana a partir de clones obtidos de sementes verdadeiras, originadas pelo cruzamento de várias espécies de *Solanum* portando diferentes genes de resistência. Os clones são selecionados para características comerciais e, posteriormente, semeados em uma área do CNPH naturalmente infestada por *R. solanacearum* biovar 1. A resistência dos clones é avaliada pela área abaixo da curva de progresso da doença, sendo considerados padrões de resistência as cultivares Achat e Cruza 148 e de suscetibilidade a cultivar Baronesa (Quezado-Soares et al. 1997; Lopes et al., 1998). De acordo com Reifschneider & Lopes (1997), os clones devem ser testados em locais onde ocorram a biovar 2 do patógeno. No Rio Grande do Sul, *R. solanacearum* é considerada endêmica, com predominância de estirpes da biovar 2. A utilização de resistência às biovars 1 ou 2 é uma importante ferramenta para o desenvolvimento de uma estratégia para o controle da murcha bacteriana (Quezado–Soares et al., 1997).

Modelos matemáticos que expressam a relação existente entre a doença e o tempo são utilizados para comparação de epidemias de uma mesma doença em diferentes épocas, locais ou mesmo para comparar diferentes doenças e os modelos obtidos pelas curvas de progresso da doença podem ser linearizados. As áreas sob a curva de progresso da doença e a inclinação destas linhas são utilizadas para avaliar cultivares com diferentes níveis de resistência. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o progresso da murcha bacteriana em cultivares e clones de batata plantados em área naturalmente infestada por estirpes da biovar 2 de *R. solanacearum* e detectar a presença do patógeno em tubérculos colhidos de plantas assintomáticas. As

cultivares e clones utilizados neste experimento já foram testados quanto à resistência a estirpes da biovar 1 nas condições do Brasil Central.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Local, data e delineamento

O experimento foi conduzido no Centro de Pesquisas de Agroindústria da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (CPA/FEPAGRO), localizado no município de Caxias do Sul, RS, em 1999 e 2000, em área naturalmente infestada com *Ralstonia solanacearum*. O CPA/FEPAGRO está localizado no Distrito de Fazenda Souza, na região da Serra do Nordeste, 29° 07' latitude sul, 50° 59' longitude oeste, altitude de 760 m. O clima é subtropical úmido e caracteriza-se como Cfb, pela classificação de Köeppen. A temperatura média anual é de 15,9 °C e a máxima de 21,8 °C. A precipitação média anual é de 1.663 mm.

O experimento foi instalado em 18 e 9 de outubro de 1999 e 2000, respectivamente. Trinta tubérculos das cultivares e clones de batata: Achat, Baraka, Baronesa, Bintje, Catucha, Clone A, Contenda, Cruza 148, Dr McIntosh, Fina, Granola, MB 03, Monalisa e Rheinhort, livres do patógeno, recebidos do Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPq/EMBRAPA), foram plantados, utilizando-se seis por parcela. O espaçamento foi de 0,8 m entre filas (parcelas) e 0,3 m entre plantas. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com cinco repetições por cultivar ou clone.

4.2.2. Progresso da murcha bacteriana

O número de plantas com sintomas de murcha foi registrado semanalmente a partir da primeira ocorrência. A curva de progresso da doença

(ASCPD) para cada cultivar ou clone na parcela, representou a soma das áreas dos polígonos formados entre as avaliações, tendo o tempo em dias como variável independente e a porcentagem de plantas com sintomas como variável dependente. A verificação da distribuição normal e o agrupamento das médias foram feitos utilizando o programa estatístico SAS/STAT, empregando o sistema de classificação de Tukey (5%).

O coeficiente de determinação (R^2) foi obtido pelo cálculo da regressão linear entre os valores transformados das variáveis dependente e independente para os modelos: Linear (sem transformação), Exponencial ($\ln x$), Logístico ($\ln x/(1-x)$), Monomolecular ($\ln 1/(1-x)$) e de Gompertz ($-\ln(-\ln x)$). Para se obter o melhor ajuste para os diferentes modelos, calculou-se o coeficiente de determinação (R^2) obtido da regressão linear entre os valores previstos (variável dependente) e observados (variável independente), ambos sem transformação, utilizando o sistema de análise estatística SAS/STAT, conforme Neher et al. (1997). A plotagem do resíduo padrão, valor observado menos o previsto, em função da variável independente, e as estimativas do desvio padrão para os coeficientes linear (a) (interseção) e angular (b) (inclinação) foi realizada.

Os ângulos de inclinação (b) das curvas ajustadas aos modelos linearizados ($y = a + bx$), foram submetidos à análise de variância para observação de diferenças na taxa de infecção (b) entre as cultivares e clones.

Para associar os sintomas de murcha ao patógeno, segmentos de 1 a 2 cm da haste de plantas com sintomas de murcha foram colocados em microtubos, contendo 500 μ l de ADE, para observação do fluxo bacteriano e as suspensões armazenadas a 5 °C para posterior isolamento de *R.*

solanacearum em meio de cultura SPA (sacarose, 20; peptona 5; K₂HPO₄.7H₂O, 0,25; agar, 15 g/l) pH 7,2 contendo 0,05% de cloreto de trifênil tetrazólio (CTT) (2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride, Sigma). Colônias fluídas com centro vermelho e bordas brancas foram transferidas para SPA e, após 48 h à 28 °C, submetidas aos testes de Gram, oxidase e DAS-ELISA. Utilizou-se anti-soro policlonal, reativo à *R. solanacearum* (Castro et al., 1993), fornecido pela EMBRAPA-CPACT. A utilização de lactose, maltose, celobiose, trealose, manitol, sorbitol e dulcitol foi testada para determinação da biovar, conforme Schaad (1988). Das plantas em que não se obteve isolados, o teste de DAS-ELISA foi realizado com a suspensão bacteriana obtida pelo fluxo bacteriano ou pela trituração de segmentos das hastes em tampão de extração.

4.2.3. Presença de *Ralstonia solanacearum* nos tubérculos oriundos de plantas assintomáticas

Os tubérculos de cada planta sem sintomas foram colhidos separadamente, armazenados à 25-27 °C até o início da brotação. Como controle negativo, tubérculos livres do patógeno foram utilizados. Um tubérculo por planta foi desinfestado com NaOCl 1% e água destilada esterilizada e a epiderme da seção do terminal estolonífero retirada. Cerca de 3 g daquela região foram retirados e triturados dentro de saco plástico contendo tampão fosfato PB 50 mM (Na₂HPO₄, 4,26; KH₂PO₄, 2,72; NaN₃, 0,1 g/l) pH 7,2 (700 µl/g de tubérculo) (Llop et al., 1999). O homogeneizado foi filtrado e centrifugado a 13.000 rpm por 10 min. O precipitado foi ressuspensionado no mesmo tampão.

Para a detecção de *R. solanacearum* por DAS-ELISA, 100 µl da suspensão obtida com o homogeneizado (amostra), foram utilizados com anti-soro policlonal produzido pela EMBRAPA-CPACT, conforme Castro et al. (1993).

A extração do DNA e a amplificação dos segmentos genômicos foram feitos conforme descrito anteriormente (Llop et al., 1999). Quinhentos microlitros da amostra foram colocados em microtubo e centrifugados a 10.000 rpm por 10 min. O precipitado foi ressuspensionado em 500 µl de tampão de extração (200 mM Tris-HCl pH 7,5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA, 0,5% SDS; 2% PVP), agitado vigorosamente e deixado em repouso à temperatura ambiente por 1 h. A seguir, a amostra foi centrifugada a 5.000 rpm por 5 min, para deposição de resíduos. Foram transferidos 450 µl para um novo microtubo e adicionado igual volume de isopropanol. A mistura foi agitada e deixada à temperatura ambiente por mais 1 h. Após este período, a mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 15 min, o sobrenadante descartado, o precipitado deixado secar e então diluído em 100 µl de água ultrapura.

A PCR foi realizada em termociclador MJ Research (Minicycler TM) num volume de 25 µl, contendo solução tampão de PCR (10 mM Tris-HCl [pH8,3] a 25 °C, 50 mM KCl, 3mM de MgCl₂), 0,2 mM (cada) dNTP, 1,25 U de polimerase *AmpliTaq* (Gibco-BRL), 1 µM dos oligonucleotídeos iniciadores (OLI1, 5'-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3'; Y2 (5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'; Cybersyn) e 3 µl da amostra (DNA diluído). As condições foram 96 °C, 2 min; (94 °C, 20 s; 68 °C, 20 s; 72 °C, 30 s) 35 vezes, e 72 °C, 10 min. Os produtos foram separados em gel de agarose 1,2% (Gibco-BRL) e eletroforese

a 4 V/cm por 2 h. Um padrão de DNA de 100 pb (Gibco-BRL) foi incluído em cada gel como marcador molecular. O gel corado com brometo de etídio foi visualizado sob luz ultra-violeta e fotografado, utilizando-se o sistema de análise de gel computadorizado (Kodak Digital Science 1D – EDAS 120).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Avaliações das áreas sob as curvas de progresso da doença

Doze avaliações para cada um dos períodos foram realizadas, semanalmente, sobre a incidência de plantas com murcha bacteriana, com início em 3 de dezembro de 1999 e término em 17 de fevereiro de 2000, para o primeiro período, e início das observações em 9 de novembro de 2000 e término em 26 de janeiro de 2001 para o segundo período. Das plantas com sintomas, foram obtidas 84 colônias fluídas brancas com centro vermelho no primeiro período e 53 no segundo, que, submetidas ao teste de ELISA, confirmaram tratar-se de *R. solanacearum*. Os testes bioquímicos resultaram na totalidade de isolados da biovar 2. Das plantas em que não se obteve isolados, o teste de DAS-ELISA foi realizado em segmentos das hastes macerados em tampão de extração ou pela suspensão obtida pelo fluxo bacteriano e confirmaram tratar-se de *R. solanacearum*.

As cultivares e clones avaliados apresentaram plantas com sintomas de murcha nas diferentes repetições, à exceção de Cruza 148 e do clone MB 03, dos quais de todas as plantas das cinco parcelas no primeiro período, não apresentaram sintomas em três e em uma parcela, respectivamente. No segundo período, até o final das avaliações, somente o clone MB 03 não apresentou plantas com sintomas de murcha em duas parcelas.

Aos 60 dias após o plantio do primeiro período (17/12/99), não apresentaram sintomas de murcha as plantas das cultivares Achat, Granola, Contenda, Cruza 148 e MB 03 e, aos 80 dias (7/01/2000), apenas Cruza 148 e MB 03 não apresentavam sintomas (Figura 1A). As demais cultivares

manifestaram sintomas antes dos 60 dias, sendo que as cultivares Baronesa, Catucha, Bintje, Dr McIntosh, Fina e Rheinhort apresentavam mais de 50% das plantas com sintomas após 80 dias (Figura 1B).

No segundo período, aos 50 dias após o plantio (30/11/2000), nenhuma planta das diferentes parcelas das cultivares Cruza 148, MB 03 e Granola apresentavam sintomas de murcha e, aos 80 dias (28/12/2000), apenas a cultivar MB 03 (Figura 2A). As demais cultivares manifestaram sintomas de murcha antes dos 50 dias de plantio, sendo que as cultivares Baronesa, Bintje, Catucha, Contenda, Dr McIntosh e Rheinhort apresentavam mais de 50 % das plantas com sintomas de murcha após 70 dias (21/12/2000) (Figura 2B).

A análise exploratória para verificação da normalidade dos dados relativos a ASCPD, indicou que as observações possuem distribuição normal para os dois períodos, sendo os dados submetidos à análise de variância. Para o primeiro período a análise de variância da ASCPD revelou serem a cultivar Cruza 148 e o clone MB 03 os mais resistentes à murcha bacteriana e as cultivares Rheinhort, Baronesa e Catucha as mais suscetíveis (Apêndice 2). Para o segundo período, a cultivar Rheinhort confirmou ser a mais suscetível, juntamente com Dr McIntosh e Catucha e, do mesmo modo, a cultivar Cruza 148 e o clone MB 03 confirmaram serem os mais resistentes (Apêndice 3).

Para uma análise comparativa dos dados relativos aos dois períodos, verificou-se a homogeneidade de variâncias e fez-se uma análise das médias das ASCPD para os dois períodos pelo TTEST (SAS/STAT). O resultado constatou homogeneidade de variâncias para as ASCPD ($Pr > 0,3005$) e não estabeleceu diferença significativa ($Pr > 0,5702$) nas médias das ASCPD para

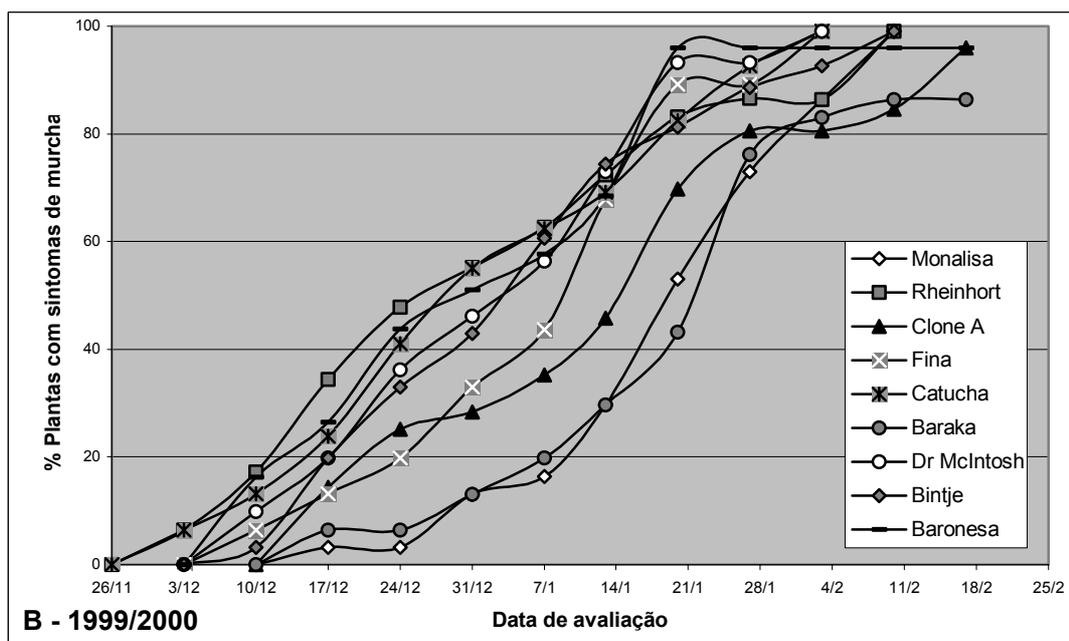
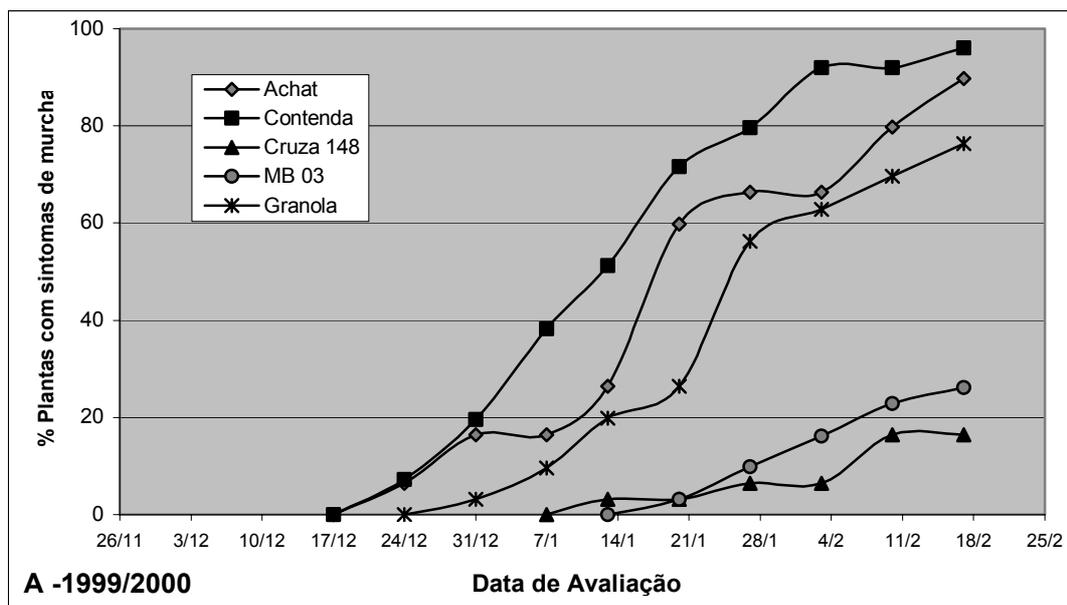


FIGURA 1 – Incidência de murcha bacteriana em plantas de batata com sintomas, média de cinco repetições. Cultivares plantadas em área naturalmente infestada com *Ralstonia solanacearum*. Dados relativos ao período 1999/2000, com data de plantio de 18/10/99. **A** – Cultivares que até os 60 dias após o plantio (17/12/99) não apresentaram sintomas de murcha; **B** – Cultivares que manifestaram sintomas antes dos 60 dias após o plantio. Porto Alegre, RS, 2002.

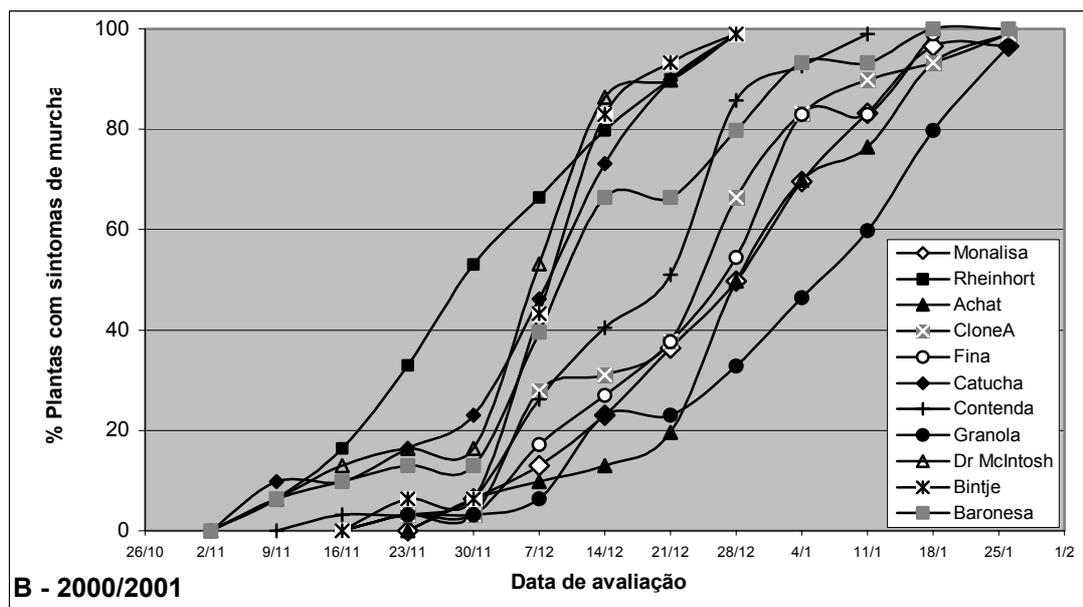
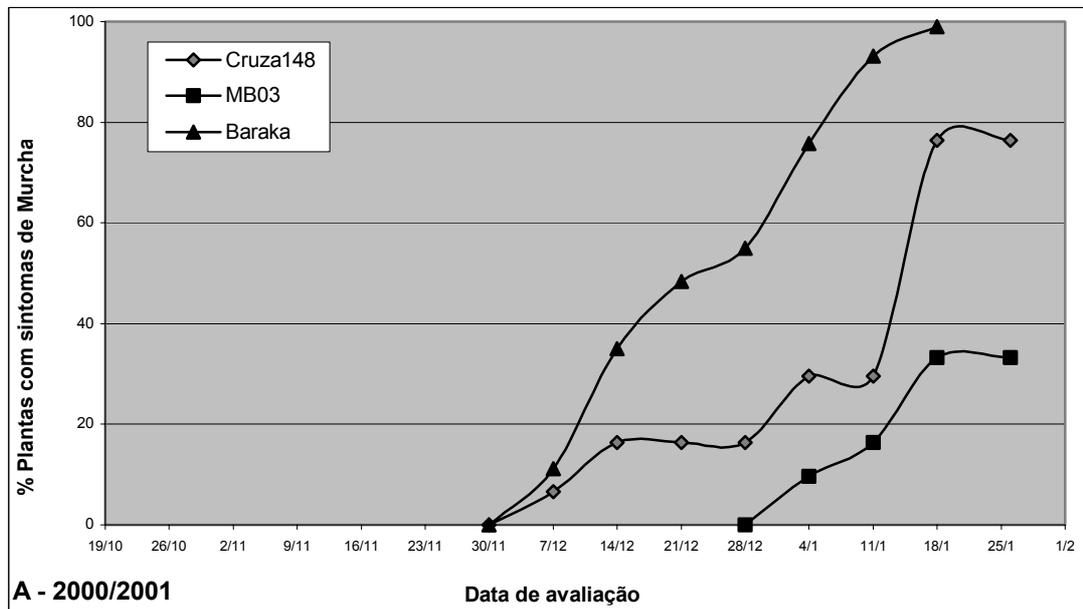


FIGURA 2 – Incidência de murcha bacteriana em plantas de batata com sintomas, média de cinco repetições. Cultivares plantadas em área naturalmente infestada com *Ralstonia solanacearum*. Dados relativos ao período (2000/2001), com data de plantio de 09/10/00. **A** – Cultivares que até os 50 dias após o plantio (30/11/00) não apresentaram sintomas de murcha; **B** – Cultivares que manifestaram sintomas antes dos 50 dias após o plantio. Porto Alegre, RS, 2002.

os dois períodos. Considerando os resultados dos dois períodos, pode-se inferir que as cultivares Rheinhort e Catucha são as mais suscetíveis e a cultivar Cruza 148 e o clone MB 03, os mais resistentes. As demais cultivares formam um grupo intermediário, que também pode ser estratificado, com o Clone A ao centro deste grupo e as cultivares Granola, Achat, Monalisa e Baraka mais próximos do grupo das resistentes e as cultivares Dr McIntosh, Bintje, Baronesa, Fina e Contenda, mais próximos dos suscetíveis.

As cultivares Baronesa e Catucha são provenientes de programa de melhoramento da região sul, selecionadas em campos sujeitos à infestação com *R. solanacearum*. No entanto, a avaliação destas cultivares confirma a afirmativa de Reifschneider & Lopes (1997), de que o material aqui selecionado comporta-se significativamente mais suscetível que a cultivar padrão Achat, que foi selecionada sem esta pressão de seleção. A cultivar Achat é, na atualidade, o único material com resistência parcial, do tipo horizontal, disponível. Está sendo gradativamente substituída, devido, principalmente, a sua baixa qualidade culinária, além de não florescer nas nossas condições, o que impossibilita a sua utilização em programas convencionais de melhoramento.

A cultivar Achat é resultante do cruzamento das cultivares Fina e Rheinhort (Hamester & Hills, 1999). É interessante notar que as duas cultivares mostraram-se mais suscetíveis do que a Achat nas condições do RS, sendo que Rheinhort foi a mais suscetível de todas as cultivares avaliadas pela ASCPD nos dois períodos consecutivos. Quezado-Soares et al. (1997) avaliaram cultivares de batata em área naturalmente infestada com *R. solanacearum* biovar 1 nas condições do Brasil Central e a cultivar Rheinhort

foi considerada como suscetível, em um sistema de classificação que variou entre resistente, suscetível e muito suscetível. De acordo com estes resultados, uma resistência parcial efetiva pode ser obtida de cultivares suscetíveis, devido à combinação adequada de genes de resistência parcial (segregação transgressiva). Há de se considerar também a proposta de Tung et al. (1990a, 1990b) e Tung (1992), que avaliaram não só genes de resistência, mas também genes que conferem adaptação ao ambiente. De acordo com estes autores, a resistência em batata é poligênica, sendo necessária uma combinação adequada de genes de resistência e de genes de adaptação ao ambiente para uma expressão efetiva da resistência à murcha bacteriana.

4.3.2. Ajuste das curvas de progresso da doença aos modelos epidemiológicos

As curvas de progresso da doença se ajustaram melhor ao modelo logístico para os dois períodos. Os resultados relativos ao coeficiente de determinação para o ajuste entre os valores observados e previstos sem transformação (R^2), o coeficiente linear (a) (interseção) e o coeficiente angular (b) (inclinação), estão relacionados por cultivar na Tabela 1. Os dados relativos à análise para os demais modelos: linear, exponencial, monomolecular e de Gompertz encontram-se nos Apêndices de 4 a 7 .

Para um ajuste adequado aos modelos propostos é de se esperar um coeficiente de determinação (R^2) superior a 80 % (Neher & Campbell, 1997). Para o modelo logístico, no primeiro período, obtiveram um ajuste superior a 80% as cultivares Contenda e Monalisa e para o segundo período, as cultivares Bintje, Dr McIntosh, Fina, Contenda e Catucha. De um modo geral, para o

segundo período, as curvas de progresso da doença obtiveram um melhor ajuste ao modelo proposto do que o primeiro período, à exceção dos cultivares Baraka, Monalisa, Baronesa e Contenda. Para qualquer dos modelos avaliados: linear, exponencial, monomolecular, logístico ou de Gompertz, o clone MB 03 obteve um coeficiente de determinação (R^2) inferior a 50% nos dois períodos e a cultivar Cruza 148 no primeiro período.

TABELA 1 – Resultado da análise de regressão linear¹ para o modelo logístico, relativo ao progresso da murcha bacteriana em cultivares e clones de batata plantados em área naturalmente infestada por *Ralstonia solanacearum*, em dois períodos. Porto Alegre, RS, 2002.

CULTIVAR	Período - 1999/2000			Período - 2000/2001		
	R ² (%)	Interseção a	Inclinação b	R ² (%)	Interseção a	Inclinação b
ACHAT	61,0	0,14	0,75	78,8	0,08	0,89
BARAKA	78,4	0,04	0,86	72,8	0,05	0,91
BARONESA	78,6	0,12	0,85	78,0	0,09	0,86
BINTJE	68,5	0,10	0,81	94,5	0,01	0,98
CATUCHA	78,2	0,02	0,95	81,5	0,05	0,92
CLONE A	70,5	0,13	0,83	77,5	0,06	0,88
CONTENDA	81,6	0,02	0,95	81,5	0,04	0,90
CRUZA 148	9,9	0,03	0,02	57,0	0,09	0,64
Dr McINTOSH	76,8	0,05	0,92	89,8	0,02	0,96
FINA	76,7	0,06	0,88	83,1	0,04	0,95
GRANOLA	60,1	0,08	0,75	71,0	0,08	0,87
MB 03	14,7	0,07	0,14	15,5	0,09	0,07
MONALISA	80,8	0,07	0,89	74,4	0,07	0,86
RHEINHORT	52,7	0,21	0,67	69,5	0,10	0,81

¹ **R²** – Coeficiente de determinação para o ajuste entre os valores observados e previstos sem transformação; **a** – Coeficiente linear (interseção); **b** – Coeficiente angular (inclinação) da equação de ajuste ao modelo logístico linearizado $Y = a + bX$.

O ângulo de inclinação (b) está relacionado com a taxa de aumento da doença no campo. Para compará-los, os ângulos foram submetidos à análise de variância, à exceção de Cruza 148 e MB 03, que não resultaram em um ajuste adequado. Não foi constatada diferença significativa pelo teste de Tukey (5%) para o primeiro período (Apêndice 8). No entanto, para o segundo período a cultivar Bintje diferiu-se significativamente das demais cultivares (Apêndice 9).

Para uma análise comparativa dos dados relativos aos dois períodos, verificou-se a homogeneidade de variâncias e fez-se uma análise das médias dos coeficientes angulares (b) para os dois períodos pelo TTEST (SAS/STAT). Esta análise demonstrou a falta de homogeneidade de variâncias para os coeficientes angulares (b) ($Pr > 0,0164$), o que impossibilita uma análise comparativa dos dados relativos aos dois períodos (1999/2000 e 2000/2001). Para uma análise comparativa mais apurada dos dados relativos à cultivar Bintje, que diferiu significativamente para o coeficiente angular (b), no segundo período, verificou-se a homogeneidade de variâncias para os dois períodos e fez-se uma análise das médias dos coeficientes angulares (b) pelo TTEST (SAS/STAT). Constatou-se homogeneidade de variâncias para esta cultivar ($Pr > 0,281$) e a análise comparativa das médias para os dois períodos estabeleceu uma diferença significativa ($Pr > 0,005$) para o coeficiente de inclinação (b). De acordo com Tung et al. (1990b), a expressão da resistência à murcha bacteriana é corroborada pela boa adaptação da espécie hospedeira a um ambiente em particular. Sendo necessário, para se obter uma resistência estável em batata, uma ampla base genética para resistência e adaptação ao ambiente onde o patógeno ocorre.

Considerando que apenas a cultivar Bintje, no segundo período, diferiu das demais cultivares em relação ao coeficiente angular (b), que está relacionado com a taxa de aumento da doença no campo, as diferenças significativas observadas pelas ASCPD podem estar relacionadas com o início do aparecimento dos sintomas. A cultivar Cruza 148 e o clone MB 03 mantiveram a capacidade de retardar o início dos sintomas nos dois períodos, bem como uma ASCPD inferior às demais cultivares. Para verificar esta possibilidade, calculou-se o coeficiente de correlação entre a ASCPD e o número de dias após o plantio em que os sintomas iniciaram. A correlação entre as variáveis foi altamente significativa ($Pr > 0,0001$) para os dois períodos e os coeficientes de regressão (r) para o primeiro período foi de -0,92 e para o segundo período, de -0,88 (Figura 3). Com base nestes resultados pode-se inferir que a resistência das cultivares está relacionada ao atraso no início da epidemia e que a ASCPD está relacionada com os dias após o plantio para o início do aparecimento dos sintomas.

Para uma análise comparativa dos dados relativos aos dois períodos, verificou-se a homogeneidade de variâncias e fez-se uma análise pelo TTEST (SAS/STAT) comparativa das médias para o número de dias após o plantio em que os sintomas iniciaram. O teste revelou homogeneidade de variâncias ($Pr > 0,72$) e a análise comparativa das médias para os dois períodos, com uma diferença altamente significativa ($Pr > 0,0001$), para o número de dias em que os sintomas iniciaram.

O experimento foi conduzido em dois períodos relativos à safra de primavera de dois anos consecutivos (1999/00 e 2000/01). No entanto, para o segundo período, os sintomas de murcha a campo iniciaram, em média, 15

dias antes que o primeiro período. O ambiente pode ter influenciado, principalmente a precipitação, favorecendo o início da epidemia durante o segundo período. Conforme dados coletados pela estação meteorológica do CPA/FEPAGRO de Caxias do Sul, no período de agosto a dezembro de 1999, a precipitação acumulada foi de 479 mm. No mesmo período do ano seguinte (2000), durante o segundo período, a precipitação acumulada foi de 870 mm, o que representa uma diferença superior a 80% no volume hídrico para o mesmo período em anos consecutivos (Apêndice 10). A precipitação média mensal para um período de 30 anos (1945 a 1974) relativa aos meses de agosto a dezembro totaliza 771 mm (Maluf et al 1989).

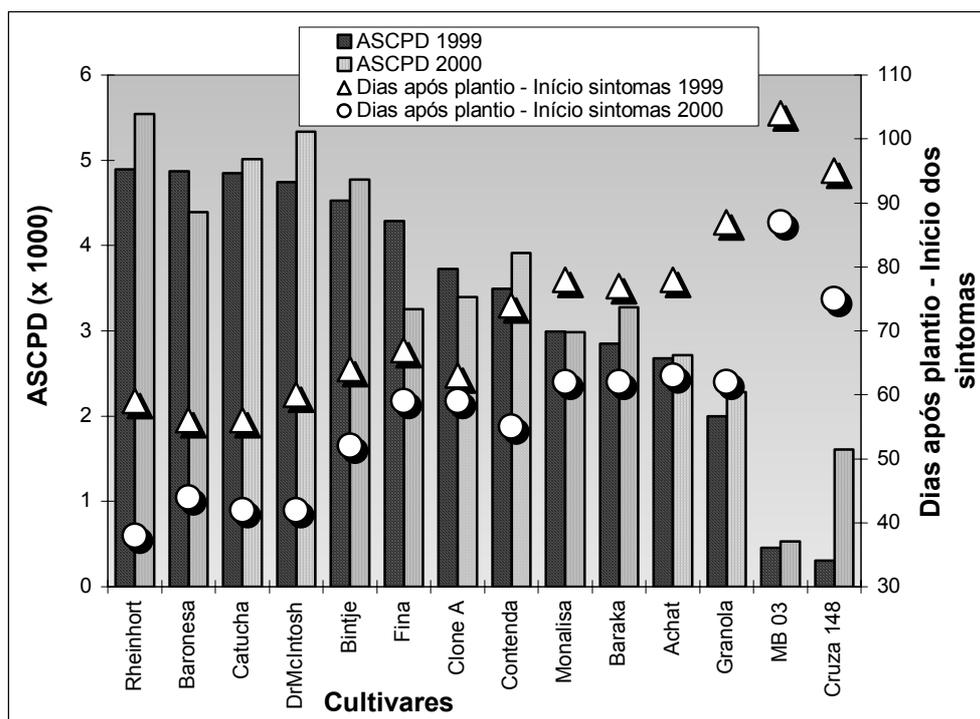


FIGURA 3 – Área sob a curva de progresso da doença (ASCPD) e número de dias após o plantio antes do início do aparecimento de sintomas a campo, em plantas de cultivares e clones de batata plantados em área naturalmente infestada com *Ralstonia solanacearum* ($P > 0,001$). Período 1999/2000 ($r = -0,92$); Período 2000/2001 ($r = -0,88$) Porto Alegre, RS, 2002.

De acordo com o Centro de Previsão do Tempo e Estudos Climáticos do Ministério da Ciência e Tecnologia, o fenômeno La Niña teve início em 1998, alcançando o ápice em 1999 e término no primeiro semestre de 2000. Este fenômeno caracteriza-se pela diminuição da temperatura das águas superficiais no Oceano Pacífico em até 3 °C. Como consequência ocorrem rápidas passagens de frentes frias sobre a Região Sul, com tendência de diminuição da precipitação nos meses de setembro a fevereiro, principalmente no RS, além do centro-nordeste da Argentina e Uruguai (CPTEC, 2001).

Como não foi possível obter para a maioria das cultivares, nos dois períodos, um ajuste aos modelos linearizados superior a 80% para o coeficiente de determinação (R^2), procurou-se então ajustar os dados aos modelos não linearizados: logístico, monomolecular, e de Gompertz, conforme Neher & Campbell (1997). O coeficiente de determinação (R^2), o erro padrão da assíntota para os parâmetros de R (taxa de aumento da doença) e de Y_0 (nível da doença na primeira observação), bem como a plotagem dos dados foram os critérios utilizados para o ajuste dos modelos. O erro padrão da assíntota para os parâmetros de R e de Y_0 , estão mais ajustados quanto mais próximos de zero. Com base nestes critérios, as cultivares se ajustaram melhor ao modelo logístico, sendo que o coeficiente de determinação para o ajuste do modelo também resultou em um número maior de cultivares com valores R^2 superiores a 80% para o primeiro período, não se alterando o número de cultivares para o segundo período. Os resultados dos ajustes para o modelo logístico não linearizado e do coeficiente de determinação encontram-se na Tabela 2. Os dados relativos à análise para os modelos monomolecular e de Gompertz, encontram-se nos Apêndices 11 e 12.

TABELA 2 – Resultado da análise de regressão para o modelo logístico não linearizado¹, relativo ao progresso da murcha bacteriana em cultivares e clones de batata plantados em área naturalmente infestada por *Ralstonia solanacearum*, em dois períodos. Porto Alegre, RS, 2002.

CULTIVAR	Período – 1999/2000			Período – 2000/2001				
	R2 (%)	Y ₀ (x10 ⁻⁶)	R _L	B	R2 (%)	Y ₀ (x10 ⁻⁶)	R _L	B
ACHAT	60,8	364	0,082	7,9	79,4	84	0,116	9,4
BARAKA	78,0	67	0,101	9,6	75,5	563	0,101	7,5
BARONESA	79,5	289	0,079	5,8	78,3	180	0,100	6,3
BINTJE	72,2	969	0,090	6,9	94,3	0,15	0,264	15,7
CATUCHA	84,2	233	0,082	6,1	82,7	266	0,141	8,2
CLONE A	71,0	194	0,072	6,2	78,1	573	0,101	7,5
CONTENDA	81,8	105	0,105	9,2	82,5	289	0,120	8,1
CRUZA 148	9,7	184	0,058	8,6	55,7	178	0,090	8,6
Dr McIntOSH	82,6	778	0,095	7,2	90,3	40	0,176	10,1
FINA	82,0	116	0,112	9,1	84,4	209	0,112	8,5
GRANOLA	61,7	159	0,084	8,7	73,3	586	0,085	7,4
MB 03	16,1	227	0,061	8,4	15,2	361	0,068	7,9
MONALISA	84,7	6,38	0,128	11,9	75,0	429	0,099	7,7
RHEINHORT	57,4	688	0,690	4,9	69,7	499	0,103	5,3

¹ R2 – Coeficiente de determinação para o modelo logístico; Y₀ – Nível da doença na primeira observação; R_L – Taxa de aumento da doença para o modelo logístico; B – Função da proporção da doença na primeira observação para o modelo logístico (-Ln(Y₀/(K-Y₀))); para a equação de ajuste não linear com K_{máx} = 1,0, $Y = 1/(1+\exp(B - R_L t))$; t = duração da epidemia.

A equação para o ajuste logístico não linearizado, considerando K_{máx} = 1 (nível máximo da doença, ou assíntota da curva de progresso da doença) é descrita pela equação: $Y = 1/(1+ \exp(B - R_L t))$, sendo B = -ln(Y₀/(k-Y₀)).

A equação de ajuste não linearizado para o modelo logístico por cultivar ou clone encontra-se na Tabela 3 e os gráficos correspondentes às curvas ajustadas para as diferentes cultivares nas Figuras 4 e 5.

TABELA 3 – Equações ajustadas ao modelo logístico não linearizado, relativas ao progresso da murcha bacteriana em cultivares e clones de batata plantados em área naturalmente infestada por *Ralstonia solanacearum*, em dois períodos. Porto Alegre, RS, 2002.

EQUAÇÃO AJUSTADA ¹ - MODELO LOGÍSTICO NÃO LINEAR		
CULTIVAR	Período 1999/2000	Período 2000/2001
ACHAT	$Y = 1/(1 + \exp(7,91 - (0,08 \times t)))$	$Y = 1/(1 + \exp(9,38 - (0,11 \times t)))$
BARAKA	$Y = 1/(1 + \exp(9,61 - (0,10 \times t)))$	$Y = 1/(1 + \exp(7,48 - (0,10 \times t)))$
BARONESA	$Y = 1/(1 + \exp(5,84 - (0,07 \times t)))$	$Y = 1/(1 + \exp(6,31 - (0,10 \times t)))$
BINTJE	$Y = 1/(1 + \exp(6,93 - (0,09 \times t)))$	$Y = 1/(1 + \exp(15,66 - (0,26 \times t)))$
CATUCHA	$Y = 1/(1 + \exp(6,05 - (0,08 \times t)))$	$Y = 1/(1 + \exp(8,23 - (0,14 \times t)))$
CLONE A	$Y = 1/(1 + \exp(6,24 - (0,07 \times t)))$	$Y = 1/(1 + \exp(7,46 - (0,10 \times t)))$
CONTENDA	$Y = 1/(1 + \exp(9,16 - (0,10 \times t)))$	$Y = 1/(1 + \exp(8,14 - (0,12 \times t)))$
CRUZA 148	$Y = 1/(1 + \exp(8,60 - (0,05 \times t)))$	$Y = 1/(1 + \exp(8,63 - (0,09 \times t)))$
Dr McIntOSH	$Y = 1/(1 + \exp(7,15 - (0,09 \times t)))$	$Y = 1/(1 + \exp(10,12 - (0,17 \times t)))$
FINA	$Y = 1/(1 + \exp(9,06 - (0,11 \times t)))$	$Y = 1/(1 + \exp(8,47 - (0,11 \times t)))$
GRANOLA	$Y = 1/(1 + \exp(8,74 - (0,08 \times t)))$	$Y = 1/(1 + \exp(7,44 - (0,08 \times t)))$
MB 03	$Y = 1/(1 + \exp(8,39 - (0,06 \times t)))$	$Y = 1/(1 + \exp(7,92 - (0,06 \times t)))$
MONALISA	$Y = 1/(1 + \exp(11,96 - (0,12 \times t)))$	$Y = 1/(1 + \exp(7,75 - (0,09 \times t)))$
RHEINHORT	$Y = 1/(1 + \exp(4,97 - (0,69 \times t)))$	$Y = 1/(1 + \exp(5,29 - (0,10 \times t)))$

¹ Doença no tempo de observação $Y = 1 / (1 + \exp(B - R \cdot t))$ ($K_{\text{máx}} = 1$).

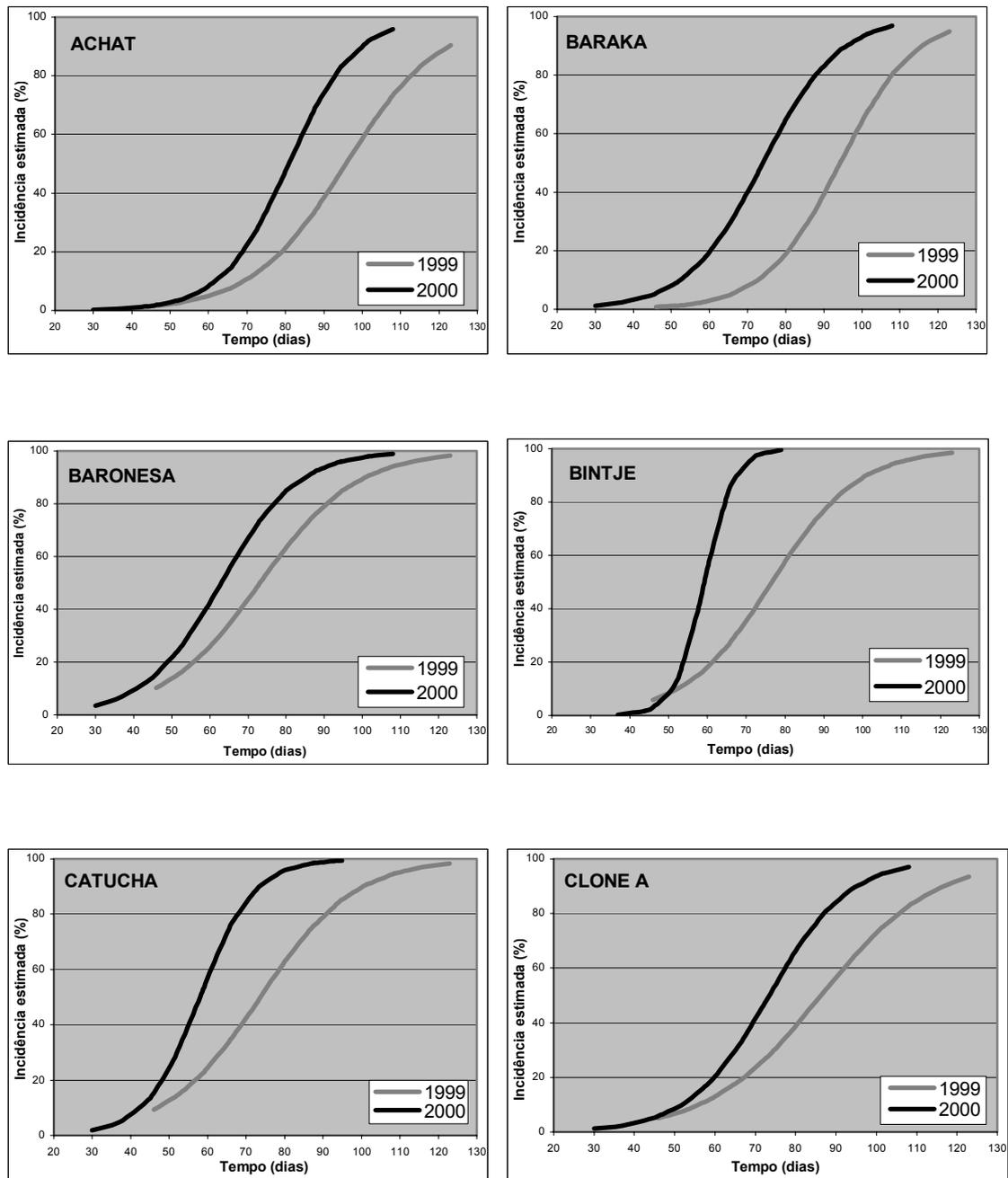


FIGURA 4 – Curvas de incidência estimada (%) de murcha bacteriana, pelo tempo (dias) para o modelo logístico não linearizado das cultivares Achat, Baraka, Baronesa, Bintje, Catucha e Clone A, relativas aos períodos de 1999/2000 e 2000/2001. Porto Alegre, RS, 2002.

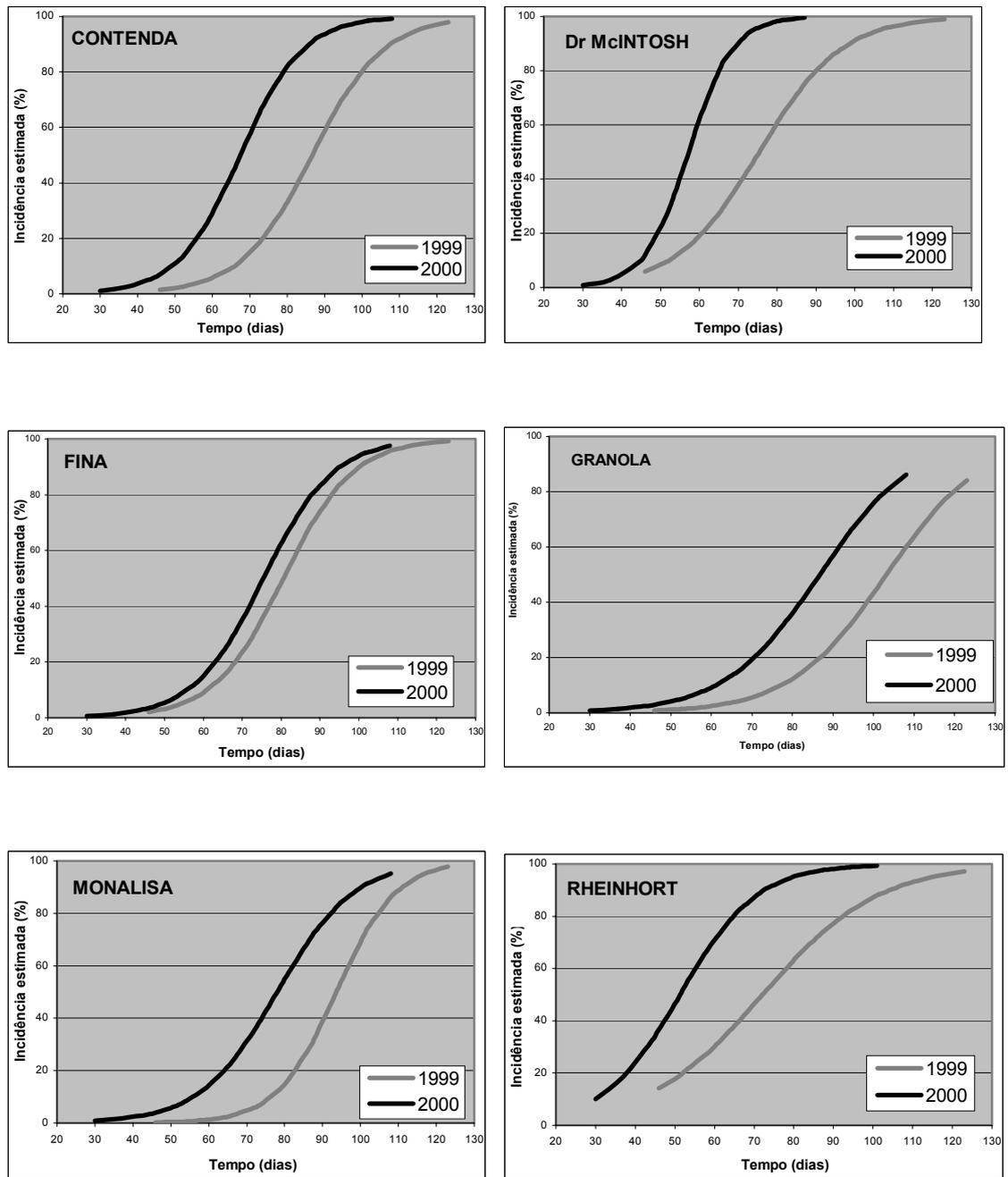


FIGURA 5 – Curvas de incidência estimada (%) de murcha bacteriana, pelo tempo (dias) para o modelo logístico não linearizado das cultivares Contenda, Dr McIntosh, Fina, Granola, Monalisa e Rheinhort, relativas aos períodos de 1999/2000 e 2000/2001. Porto Alegre, RS, 2002.

O coeficiente de determinação (R^2) para o modelo logístico não linearizado também não foi satisfatório para o clone MB 03 e para a cultivar Cruza 148 no primeiro período, possivelmente devido à duração da epidemia para estes genótipos, que foi de 28 e 35 dias, respectivamente, o que corresponde a quatro ou cinco datas de observação. Para o segundo período o clone MB 03 manifestou sintomas apenas nas quatro últimas observações. De acordo com Neher & Campbell (1997) o modelo de ajuste pode falhar devido ao número de observações (datas de coleta de dados), não ser suficiente para cobrir características importantes do modelo.

4.3.3. Detecção de *Ralstonia solanacearum* em tubérculos de plantas sem sintomas

Os tubérculos colhidos de plantas sem sintomas e armazenados a temperatura de 25-27 °C até o início da brotação não apresentaram sintomas de descoloração vascular quando seccionados transversalmente. Os mesmos foram submetidos aos testes de DAS-ELISA e PCR e os resultados relativos aos dois períodos estão relacionados por cultivar na Tabela 4.

Tubérculos de 66 plantas sem sintomas de murcha bacteriana foram colhidos para o primeiro período e de 29 plantas para o segundo. Os tubérculos, um por planta, foram submetidos ao teste de DAS-ELISA com anti-soro reativo à *R. solanacearum* e resultaram em 37 amostras positivas para o primeiro período e em 11 para segundo, que representam um percentual de 56% e 38%, respectivamente. Como resultado da amplificação do DNA por PCR, foram visualizados, em gel de agarose, produtos de 288 pb para amostras consideradas positivas (Seal et al., 1993). Os resultados dos testes

de PCR elevaram a proporção de amostras positivas em relação ao DAS-ELISA para o primeiro e segundo períodos em 74% e 55%, respectivamente.

TABELA 4 – Número de amostras positivas para *Ralstonia solanacearum* pelos testes de DAS-ELISA e PCR, de tubérculos obtidos de plantas sem sintomas de murcha bacteriana, das cultivares e clones de batata plantados em área naturalmente infestada em dois períodos. Porto Alegre, RS, 2002.

PERÍODO	CULTIVAR ¹	Número de Amostras ²	DAS-ELISA ³	PCR ⁴
1999/2000	Achat	3	2	2
	Baraka	4	4	4
	Baronesa	1	0	1
	Clone A	1	0	1
	Contenda	3	0	2
	Cruza 148	25	15	20
	Granola	7	7	7
	MB 03	22	9	12
2000/2001	Cruza148	7	5	6
	Granola	1	0	0
	MB 03	20	6	9
	Monalisa	1	0	1
TOTAL		95	48	65

¹ Cultivares e clones de batata que ao final das avaliações apresentavam plantas sem sintomas de murcha bacteriana.

² A amostra consistiu de um tubérculo por planta assintomática, com duas repetições.

³ Anti-soro policlonal reativo a *R. solanacearum* (Castro et al. 1993).

⁴ Oligonucleotídeos iniciadores Oli 1 e Y2 (Seal et al., 1993).

Llop et al. (1999) avaliaram o mesmo conjunto de oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho (Oli 1 e Y2) (Seal et al., 1993), em amostras de tubérculos de batata e constataram uma eficiência superior na detecção de infecções latentes por PCR, quando comparada com anti-soros policlonais utilizados em testes de ELISA e Imunofluorescência, bem como por métodos microbiológicos. Llop et al., (1999), utilizando o mesmo método de

extração de DNA em amostras de tubérculos de batata, definiram o limite de sensibilidade para detecção de *R. solanacearum* por PCR em 10^2 UFC/ml.

Com a finalidade de monitorar a ocorrência de *R. solanacearum* em tubérculos de batata e de atender às medidas fitossanitárias que visam minimizar o risco de disseminação do patógeno por tubérculos com infecções latentes, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos com o objetivo de obter métodos rápidos e sensíveis para detecção de *R. solanacearum* (Elphinstone et al., 1996; Priou et al., 1999; Llop et al., 1999; Martins, 2000). De um modo geral, os trabalhos têm relacionado níveis diferentes de sensibilidade para as metodologias propostas. Seal et al. (1993) relataram a detecção de até 10 células de *R. solanacearum* utilizando PCR. Resultados com este nível de sensibilidade não puderam ser obtidos por outros autores como Elphinstone et al. (1996) e Martins (2000). Novos procedimentos têm permitido um aumento na sensibilidade das técnicas de detecção, como os obtidos por Elphinstone et al. (1996) pela utilização de meio semi-seletivo para enriquecimento da amostra e pelo acréscimo de 0,05 M de NaOH e aquecimento a 100 °C por 6 min da amostra para PCR.

Martins (2000) determinou a sensibilidade da técnica de PCR para amostras de tubérculos de batata em $3,7 \times 10^3$ UFC/ml, sem o pré-tratamento proposto por Elphinstone et al. (1996) e concluiu que o método microbiológico é muito mais sensível e, portanto, recomendado como procedimento padrão para detecção de *R. solanacearum*. De acordo com Martins (2000), a técnica de PCR pode ser um método adicional, útil e muito valioso para patógenos que não podem se desenvolver em meios seletivos de crescimento. Entretanto, a Organização Europeia e do Mediterrâneo para proteção de plantas recomenda

a utilização de PCR, cultivo da bactéria em meio semi-seletivo, teste de imunofluorescência e testes biológicos em mudas de tomate e berinjela (OEPP/EPPO, 1998, 1999).

5. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos, nas condições em que estas pesquisas foram conduzidas, chegou-se às seguintes conclusões:

1 – Estirpes de *Ralstonia solanacearum* das biovars 1 e 2, com predominância da última, estão presentes nas lavouras das principais regiões produtoras de batata do Rio Grande do Sul (RS).

2 – Existe pouca variabilidade genética entre estirpes da mesma biovar na população de *R. solanacearum* presente em lavouras de batata no RS.

3 - A variabilidade genética de estirpes de *R. solanacearum* está associada à região agroecológica.

4 – A cultivar Cruza 148 e o clone MB 03 de batata são mais resistentes à murcha bacteriana (MB) do que Achat, Baraka, Baronesa, Bintje, Catucha, Clone A, Contenda, Dr McIntosh, Fina, Granola, Monalisa e Rheinhort.

5 – Os genótipos de batata mais resistentes à MB não são isentos de infecções latentes por *R. solanacearum*.

6 – O modelo logístico é o mais adequado para avaliar a resistência de cultivares e clones de batata à MB.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, H. Bacterial wilt in Malasya: hosts, disease incidence and geographical distribution. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT CONFERENCE, 1992, Taiwan. **Proceedings...** Canberra: ACIAR, 1993, p.334-337.
- BLACK, R.; ELPHINSTONE, J. Developing appropriate detection methods for developing countries. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SYMPOSIUM, 1997, 2., Guadalupe. **Reports...** Paris: INRA, 1998. p.123-127.
- BOMAN, H.G. Antibacterial peptides: key components needed in immunity. **Cell**, Cambridge, v. 65, n.2, p.205-207, 1991.
- BOMAN, H.G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 13, p. 61-92, 1995.
- BOMAN, H.G.; HULMARK, D. Cell-free immunity in insect. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.41, p.103-126, 1987.
- BOUCHER C.A.; VAN GIJSEGEM, F.; BARBERIS, P.A.; ARLAT, M.; ZISCHEK, C. *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenicity on tomato and hipersensitivity on tobacco are clustered. **Journal of Bacteriology**, Oxford, v.169, n.12, p.5626-5632, 1987.
- BUDDENHAGEN, I.; KELMAN, A. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 12, p.203-230, 1964.
- BUDDENHAGEN, I.; SEQUEIRA, L.; KELMAN, A. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, St. Paul, v.52, n.8, p.726, 1962. Resumo.
- CASTRO, L.A.S.; DANIELS, J.; COUTO, M.E.O. Utilização do teste de ELISA na diagnose de *Pseudomonas solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, n.3, p.296, 1993. Resumo.

CIAMPI, L.; SEQUEIRA, L. Multiplication of *Pseudomonas solanacearum* in resistant potato plants and the establishment of latent infections. **American Potato Journal**, Bangor, v.57, p.319-329, 1980.

CIAMPI, L.; SEQUEIRA, L.; FRENCH, E.R. Latent infection of potato tubers by *Pseudomonas solanacearum*. **American Potato Journal**, Bangor, v.57, p.377-386, 1980.

COOK, D.; BARLOW, E.; SEQUEIRA, L. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St Paul, v.2, n.3, p.113-121, 1989.

CPTEC. Cachoeira Paulista/SP, Centro de Pesquisa de Previsão do Tempo e Estudos Climáticos do Ministério de Ciência e Tecnologia, 1998-2001. Contém informações sobre a previsão do clima, produtos de satélites, Banco de dados, Pesquisas e Serviços. Disponível em: <<http://www.cptec.inpe.br>>. Acesso em 10.12.2001.

CRISCI, J.V.; ARMENGOL, M.F.L. **Introduction a la teoria practica de la taxonomia numerica**. Washington: Secretaria General de la Organización de los Estado Americanos, 1983. 131p.

DI CELLO, F.; BEVENINO, A.; CHIARINI, L.; FANI, R.; PATTETTI, D.; TABACCHIONI, S.; DALMASTRI, C. Biodiversity of *Burkholderia cepacia* population isolated from de maize rhizosphere at different plant growth stages. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.11, p.4485-4493, 1997.

ELPHINSTONE, J.G. Inheritance of resistance to bacterial diseases. In: BRADSHAW, J.E.; MACKAY, G.R. Eds. **Potato genetics**. Wallingford, UK: CABI International, 1994. p.429-446.

ELPHINSTONE, J.G.; ALEY, P. Integrated control of bacterial wilt potato in the warm tropics of Peru. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT CONFERENCE, 1992, Taiwan. **Proceedings...** Canberra: ACIAR, 1993. p.276-283.

ELPHINSTONE, J.G.; HENNESSY, J.; WILSON, J.K.; STEAD, D.E. Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. **OEPP/EPPO Bulletin (Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protecion des Plantes)**, Paris, v.26, p.663-678, 1996.

ELPHINSTONE, J.G.; STANFORD, H.M.; STEAD, D.E. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers, *Solanum dulcamara* and associated irrigation water. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SYMPOSIUM, 2., 1997, Guadeloupe. **Reports...** Paris:INRA, 1998. p.133-139.

FEGAN, M.; HOLOWAY, G.; HAYWARD, A.C.; TIMMIS, J. Development of a diagnostic test based on the polymerase chain reaction (PCR) to identify strains of *R. solanacearum* exhibiting the biovar 2 genotype. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SYMPOSIUM, 2., 1997, Guadeloupe. **Reports...** Paris: INRA, 1998. p.35-43.

FOCK, I.; COLLONNIER, C.; PURWITO, A.; LUISETTI, J.; SOUVANNAVONG, V.; VEDEL, F.; SERVAES, A.; AMBROISE, A.; KODJA, H.; DUCREUX, G. SIHACHAKR, D. Resistance to bacterial wilt in somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. **Plant Science**, Limerick, v.160, n.1, p.165-176, 2000.

FRENCH, E.R.; ANGUIZ, R.; ALEY, P. The usefulness of potato resistance to *Ralstonia solanacearum*, for the integrated control of bacterial wilt. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SYMPOSIUM, 2., 1997, Guadeloupe. **Reports...** Paris: INRA, 1998. p.381-385.

FRENCH, E.R.; ALEY, P.; TORRES, E.; NYDEGGER, U. Diversity of *Pseudomonas solanacearum* in Peru and Brazil. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT CONFERENCE, 1992, Taiwan. **Proceedings...** Camberra: ACIAR, 1993. p. 70-77.

FRENCH, E.R. Control integrado de la marchitez bacteriana de la papa causada por el biovar 2-raza 3 de *Pseudomonas solanacearum*. In: TALLER SOBRE ENFERMEDADES BACTERIANAS DE LA PAPA, 1993, Brasília, **Memórias...** Brasília: EMBRAPA/CNPH, 1994. p.39-41.

FREY, P.; SMITH, J.J.; ALBAR, L.; PRIOR, P.; SADDLER, G.S.; TRIGALET-DEMERY, D.; TRIGALET, A. Bacteriocin typing of *Burkholderia (Pseudomonas) solanacearum* race 1 of the French West Indies and correlation with genomic variation of the pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.2, p.473-479, 1996.

GAO, G.; QU, D.Y.; LIAN, Y.; JIN, L.; FENG, L. Identification molecular markers linked with resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) in diploid potato. **Acta Horticulturae Sinica**, Taipei, v.27, n.1, p.37-41, 2000.

GILLINGS, M.; FAHY, P. Genomic fingerprinting and PCR analysis: rapid, sensitive and inexpensive means of differentiating strains of *Pseudomonas solanacearum*. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT CONFERENCE, 1992, Taiwan. **Proceedings...** Canberra: ACIAR, 1993. p. 85-92.

GRIMAUULT, V.; ANAIS, G.; PRIOR, P. Distribution of *Pseudomonas solanacearum* in the stem tissues of tomato plants with different levels of resistance to bacterial wilt. **Plant Pathology**, Oxford, v. 43, p.633-668, 1994.

HAMESTER, W.; HILLS, V. **World catalogue of potato varieties**. Bergen: Agrimedia, 1999. 207p.

HAYWARD, A.C. *Pseudomonas solanacearum*. In: SINGH, U.; SINGH, R.; KOHMOTO, K. Eds. **Pathogenesis and host specificity in plant diseases: Histopathological, biochemical, genetic and molecular bases**. Oxford: Pergamon, 1995. v.1, p.139-151.

HAYWARD, A.C. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: HAYWARD, A.C.; HARTMAN, G.L. Eds. **Bacterial Wilt: The Disease and its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford, UK: CAB International, 1994. p.123-135.

HAYWARD, A.C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 29, p.65-87, 1991.

HAYWARD, A.C. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.27, n.2, p.265-277, 1964.

HE, L.Y.; SEQUEIRA, L.; KELMAN. A. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. **Plant Disease**, St. Paul, v. 67, n.12, p.1357-1361. 1983.

HORITA, M.; TSUCHIYA, K. Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 91, n.4, p.399-407, 2001.

HORITA, M.; TSUCHIYA, K. Diversity of *Ralstonia solanacearum* in tomato rhizosphere soil. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SYMPOSIUM, 2., 1997, Guadeloupe. **Reports...** Paris: INRA, 1998. p.74-81.

HULTON, C.S.J.; HIGGINS, C.F.; SHARP, P.M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, Salem, v.5, n.4, p.825-834, 1991.

ITO, S.; FUJII, T.; USHIJIMA, Y.; TANAKA, S.; KAMEYA, I.M.; YOSHIWARA, S.; KISHI, F. Genomic diversity of field isolates of *Burkholderia solanacearum* in Japan. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.144, n.9, p. 501-504, 1996.

JAUNET, T.X.; WANG, J.F. Variation in genotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan. **Phytopathology**, St. Paul, v.89, n.4, p.320-327, 1999.

JAUNET, T.; WANG, J.F. Population structure of *Ralstonia solanacearum* from a disease nursery and tomato production fields in Taiwan. In: PRIOR, P.H.; ALLEN, C.; ELPHINSTONE, J. (Eds.) **Bacterial wilt disease: Molecular and ecological aspects**. Berlin: Springer, Verlag, 1998. p83-88.

JAUNET, T.; LEE, J.; HSU, C.F.; WANG, J.F. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of tomato bacterial wilt in Taiwan. **TVIS Newsletter**, Tainan, v.1, n.2, p.20-21, 1996.

JAYNES, J.M.; NAGPALA, P.; DESTÉFANO-GELTRAN, L.; HUANG, J.H.; KIM, J.; DENNY, T.; CETINER, S. Expression of a cecropin B lytic peptide analog in transgenic tobacco confers enhanced resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Plant Science**, Ireland, v. 89, p.43-53. 1993.

JUDD, A.K.; SCHNEIDER, M.; SADOWSKI, M.J. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, n.6, p.1702-1708, 1993.

KELMAN, A. One hundred and one years of research on bacterial wilt. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SYMPOSIUM, 2., 1997, Guadaloupe. **Reports...** Paris: INRA, 1998. p.1-5.

KELMAN, A. Brown rot. In: WOOKER, W.J. Ed. **Compendium of potato diseases**. St Paul: APS, 1986. p.29-30.

KUEHNLE, A.R.; CHEN, F.; SUGII, N. Novel approaches for genetic resistance to bacterial pathogens in flower crops. **HortScience**, Alexandria, v.30, n.3, p. 456-461. 1995.

LEBEN, C. Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, St. Paul, v.3, p.209-230, 1965.

LEE, Y.; WANG, C. The design of specific primers for the detection of *Ralstonia solanacearum* in soil samples by polymerase chain reaction. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v.41, n.2, p.121-128, 2000.

LLOP, P.; CARUSO, P.; CUBERO, J.; MORENTE, C.; LÓPEZ, M.M. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.37, n.1, p.23-31. 1999.

LOPES, C.A. Ecologia de *Pseudomonas solanacearum*. In: TALLER SOBRE ENFERMEZAS BACTERIANAS DE LA PAPA, 1993, Brasília, **Memórias...** Brasília: EMBRAPA/CNPH, 1994. p.17-22.

LOPES, C.A.; TAKATSU, A. Controle da murcha bacteriana. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, p.16, 1997. Suplemento

LOPES, C.A.; NAZARENO, N.R.X.; FURIATTI, R.S. Prevalência mas não exclusividade da raça 3 de *Pseudomonas solanacearum* em batata no Estado de Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, p.312, 1993. Suplemento

LOPES, C.A.; SANTOS, M.; GOEPFTER JUNIOR, F.; NOGUEIRA, P. Condenação de campos de certificação de batata-semente pela murcha bacteriana no Brasil, safra 1986/87. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.8, n.2, p.14-16, 1990.

LOPES, C.A.; GIORDANO, L.B. Avaliação da resistência de oito clones e três cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) à murcha bacteriana causada por *Pseudomonas solanacearum*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.1, n.1, p.33-35, 1983.

LOPES, C.A.; QUEZADO-SOARES, A.M.; BUSO, J.A.; MELO, P.E. Breeding for resistance to bacterial wilt of potatoes in Brazil. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SYMPOSIUM, 2., 1997, Guadeloupe. **Reports...** Paris: INRA, 1998. p.291-293.

MACIEL, J.L.N.; DUARTE, V.; SILVEIRA, J.R.P.; VAN DER SAND, S.T. Frequência de biovares de *Ralstonia solanacearum* em diferentes cultivares e épocas de cultivo de batata no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, n.4, p.741-744, 2001.

MACIEL, J.L.N. **Biovares e densidade populacional de *Ralstonia***

***solanacearum* em cultivares de batata nas condições do Rio Grande do**

Sul. Porto Alegre, 1999. 143f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-

Graduação Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

MALUF, J.R.T.; DIDONÉ, I.; BERLATO, M.A. (Coord.) **Atlas agroclimático**.

Porto Alegre: Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado do Rio grande do Sul, 1989. 145p.

MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, N.S.S.; MICHEREFF, S.J. Bacterial wilt in Brazil: current status and control methods. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SYMPOSIUM, 2., 1997, Guadeloupe. **Reports...** Paris: INRA, 1998. p.386-393.

MARTIN, B.; HUMBERT, O.; CAMARA, M.; GUENZI, E.; WALKER, J.; MITCHELL, T.; ANDREW, P.; PRUDHOMME, M.; ALLOING, G.; HAKENBECK, R.; MORRISON, D.A.; BOULNOIS, G.J.; CLAVERYYS, J.P. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.20, n.13, p.3479-3483, 1992.

MARTINS, O.M. **Polymerase chain reaction in the diagnosis of bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al**. Göttingen, 2000. 131f. Doctoral Dissertation, Institute of Plant Pathology and Plant Protection of the Georg-August University, Göttingen, Germany, 2000.

MARTINS, O.M.; COUTO, M.E.O. Variabilidade genética e distribuição geográfica de biovares de *Ralstonia solanacearum* no Rio Grande do Sul. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3., 2001, Londrina. **Resumos...** Londrina: IAPAR, 2001. p.492-493.

McARTHUR, J.V.; KOVACIC, D.A.; SMITH, M. Genetic diversity in natural populations of soil bacterium across a landscape gradient. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.85, p.9621-9624, 1988.

MONTANELLI, C.; STEFANINI, F.M.; CHIARI, A.; CHIARTI, T.; NASCARI, G. Variability in the response to *Pseudomonas solanacearum* of transgenic lines of potato carrying a cecropin gene analogue. **Potato Research**, Wageningen, v. 38, p. 371-378, 1995.

NEHER, D.A.; CAMPBELL, C.L. Analysis of disease progress curves using nonlinear models. In: FRANCL, L.J.; NEHER, D.A. **Exercises in plant disease epidemiology**. St. Paul: APS, 1997. p.38-40.

NEHER, D.A.; REYNOLDS, K.L.; CAMPBELL, C.L. Analysis of disease progress curves using linear models. In: FRANCL, L.J.; NEHER, D.A. **Exercises in plant disease epidemiology**. St. Paul: APS, 1997. p.29-33.

OEPP/EPPO. Surveys carried out in Germany on *Ralstonia solanacearum*. **EPPO Reporter Service**, Paris, v.98, n.147, 1998.

OEPP/EPPO. Surveys on *Clavibacter michiganense* subspecies *sepedonicus* and *Ralstonia solanacearum* in Germany. **EPPO Reporter Service**, Paris, v.99, n.54, 1999.

OLSSON, K. Experience of brown rot caused by *Pseudomonas solanacearum* in Sweden. **OEPP/EPPO Bulletin (Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes)**, Paris, v.6, p.199-207, 1976.

PALLERONI, N.J.; KUNISAWA, R.; CONTOPOULOU, R. DOUDOROFF, M. Nucleic acids homologies in the genus *Pseudomonas*. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 23, n.3, p.333-339, 1973.

PRIOU, S.; GUTARRA, L.; FERNANDEZ, H.; ALEY, P. Sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in latently infected potato tubers and soil by post-enrichment ELISA. In: CIP. **Impact in a changing world**. Lima: International Potato Center, 1999. 458p. Program Report 1997-98.

QUEZADO-SOARES, A.M.; LOPES, C.A.; BUSO, J.A.; MELO, P. Evaluation in Brazil of potato clones resistant to bacterial wilt in the Philippines. **Bacterial Wilt Newsletter**. Queensland, v.14, n.14, p.1-3, 1997.

RAMOS, R.M. (Coord.) **Estudo da cadeia produtiva da batata no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: FEPAGRO, 1998. 68p.

RAO, A.G. Antimicrobial peptides. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St. Paul, v.8, n.1, p.6-13, 1995.

REIFSCHNEIDER, F.J.B.; LOPES, C.A. Resistência de plantas a fitobactérias. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 30., 1997, Poços de Caldas. **Resumos...** Brasília: SBF, 1997. p.41-46.

RIO GRANDE DO SUL. **Macrozoneamento Agroecológico e Econômico do Estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura e Abastecimento: EMBRAPA/CNPT, 1994. 307p.

ROWE, P.R.; SEQUEIRA, L. Inheritance of resistance to *Pseudomonas solanacearum* in *Solanum phureja*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, n.10, p.1499-1501, 1970.

ROWE, P.R.; SEQUEIRA, L.; GONZALES, L.C. Additional genes for resistance to *Pseudomonas solanacearum* in *Solanum phureja*. **Phytopathology**, St. Paul, v.62, n.9, p.1093-1094, 1972.

SAILE, E.; Mc GARVEY, J.A.; SCHELL, M.A.; DENNY, T.P. Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. **Phytopathology**, St. Paul, v.87, n.12, p. 1264-1271, 1997.

SALAVA, J.; BRYXIOVA, M.; KOKOSKOVA, B. Identification of plant pathogenic bacteria by random polymorphic DNA (RAPD) assay. **Plant Protection Science**, Beersheva, v.34, n.4, p.137-141, 1998.

SCHAAD, N.W. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. St. Paul: APS Press, 1988. v2, 146p.

SEAL, E.S.; TAGHAVI, M.; FEGAN, N.; HAYWARD, A.C.; FEGAN, M. Determination of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* rRNA subgroups by PCR tests. **Plant Pathology**, Oxford, v.48, p.115-120, 1999.

SEAL, E.S.; JACKSON, L.A.; DANIELS, M.J. Use of tRNA consensus primers to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by polymerase chain reaction amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.11, p.3759-3761, 1992.

SEAL, E.S.; JACKSON, L.A.; DANIELS, M.J. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the blood

disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. **Journal of General Microbiology**, Londres, v.139, n.7, p.1587-1594, 1993.

SMITH, J.J.; KIBATA, G.N.; NURIMI, Z.K.; LUM, K.Y.; FERNANDEZ-NORTHCOTE, E.; OFFORD, L.C.; SADDLER, G.S. Biogeographic studies on *Ralstonia solanacearum* race 1 and 3 by genomic fingerprinting. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SYMPOSIUM, 2., 1997, Guadeloupe. **Reports...** Paris: INRA, 1998. p.50-55.

SMITH, J.J.; OFFORD, L.C.; HOLDERNESS, M.; SADDLER, G.S. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.12, p.4263-4268, 1995.

STERN, M.J.; AMES, G.F.; SMITH, N.H.; ROBINSON, E.C.; HIGGINS, C.F. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell**, Cambridge, v.37, n.3, p.1015-1026, 1984.

TAKATSU, A.; LOPES, C.A. Murcha bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle. **Horticultura Brasileira**, Brasília. v.15, p. 170-177, 1997. Suplemento

THWAITES, R.; MANSFIELD, J.; EDEN-GREEN, S; SEAL, S. RAPD and rep PCR-based fingerprinting of vascular bacterial pathogens of *Musa* spp. **Plant Pathology**, Oxford, v.48, n.1, p. 121-128, 1999.

TRIGALET-DEMERY, D.; MONTROZIER, H.; ORGAMBIDE, G.; PATRY, V.; ADAM, O.; NAVARRO, L.; COTELLE, V.; TRIGALET, A. Exopolysaccharides of *Pseudomonas solanacearum*: relation to virulence. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT CONFERENCE, 1992, Taiwan. **Proceedings...** Canberra: ACIAR, 1993. p.312-315.

TSUCHIYA, K. HORITA, M. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* in Japan. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SYMPOSIUM, 2., 1997, Guadeloupe. **Reports...** Paris: INRA, 1998. p.61-73.

TUNG, P.X.; RASCO, E.T.; ZAAG, P.V.; SCHMIEDICHE, P. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in the potato: I Effects of sources of resistance and adaptation. **Euphytica**, Alexandria, v. 45, n.3, p.203-210, 1990a.

TUNG, P.X.; RASCO, E.T.; ZAAG, P.V.; SCHMIEDICHE, P. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in the potato: II Aspects of host-pathogen-environment interaction. **Euphytica**, Alexandria, v. 45, n.3, p.211-215, 1990b.

TUNG, P.X. Genetic variation for bacterial wilt resistance in a population of tetraploid potato. **Euphytica**, Alexandria, v.61, n.1, p.73-80, 1992.

VAN DER WOLF, J.M.; BONANTS, P.J.; SMITH, J.J.; HAGENAAR, M.; NIJHUIS, E.; VAN BECKHOVEN, J.R.C.M.; SADDLER, G.S.; TRIGALET, A.; FEUILLADE, R. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* race 3 in western Europe determined by AFLP, RC-PFGE and Rep-PCR. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SYMPOSIUM, 2., 1997, Guadeloupe. **Reports...** Paris: INRA, 1998. p.44-49.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**. Oxford, v.19, n. 24, p.6823-6831, 1991.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v.5, p.25-40, 1994.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n.24, p7213-7218, 1990.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Genomic fingerprints produced by PCR with *consensus* tRNA gene primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.19, n4, p.861-866.1991.

WILKINSON, L.; HILL, M.; WELNA, J.P. **Statistics**. Chicago:Systat, 1992.750p.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1891) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 36, n.12, p.1251-1275, 1992.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; YANO, I.; HOTTA, H.; NISHIUCHI, Y. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: Proposal of *Ralstonia picketti* (Ralston, Palleroni and Duodoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 39, n.11, p.897-904, 1995.

YUI, M; MONMA, S.; HIRAI, M.; NISHIMURA, S.; UKAI, Y.; ENOMOTO, S. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for the selection of the tomatoes resistant to bacterial wilt. **Bulletin of the National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea**, Mie, v.14, p.189-198, 1999.

ZHANG, Z.; COYNE, D.P.; VIDAVER, A.K.; MITRA, A. Expression of human lactoferrin cDNA confers resistance to *Ralstonia solanacearum* in transgenic tobacco plants. **Phytopathology**, St. Paul, v. 88, n.7, p.730-734, 1998.

APÊNDICES

Página

CAPÍTULO III

- 1 - Matriz dos coeficientes de similaridade obtida com a análise de RAPD dos isolados de *Ralstonia solanacearum*. 90

CAPÍTULO IV

- 2 - Análise de variância da variável área sob a curva de progresso da doença (ASCPD), para as cultivares e clones de batata plantados em área naturalmente infestada com *Ralstonia solanacearum* no primeiro período (1999/2000). Porto Alegre, RS, 2002. 95
- 3 - Análise de variância da variável área sob a curva de progresso da doença (ASCPD), para as cultivares e clones de batata plantados em área naturalmente infestada com *Ralstonia solanacearum* no segundo período (2000/2001). Porto Alegre, RS, 2002. 96
- 4 - Resumo da análise de regressão para os dados transformados aos modelos epidemiológicos, de cultivares e clones de batata plantados em área naturalmente infestada por *Ralstonia solanacearum*, biovar 2. Caxias do Sul, período 1999/2000. Porto Alegre, RS, 2002. 97
- 5 - Resumo da análise de regressão para os dados não transformados aos modelos epidemiológicos, de cultivares e clones de batata plantados em área naturalmente infestada por *Ralstonia solanacearum*, biovar 2. Caxias do Sul, período 1999/2000. Porto Alegre, RS, 2002. 98
- 6 - Resumo da análise de regressão para os dados transformados aos modelos epidemiológicos, de cultivares e clones de batata plantados em área naturalmente infestada por *Ralstonia solanacearum*, biovar 2. Caxias do Sul, período 2000/2001. Porto Alegre, RS, 2002. 99

	Página
7 - Resumo da análise de regressão para os dados não transformados aos modelos epidemiológicos, de cultivares e clones de batata plantados em área naturalmente infestada por <i>Ralstonia solanacearum</i> , biovar 2. Caxias do Sul, período 2000/2001. Porto Alegre, RS, 2002.	100
8 - Análise de variância da variável ângulo de inclinação (b) da equação de ajuste ao modelo logístico, para as cultivares e clones de batata plantados em área naturalmente infestada com <i>Ralstonia solanacearum</i> no primeiro período (1999/2000). Porto Alegre, RS, 2002.	101
9 - Análise de variância da variável ângulo de inclinação (b) da equação de ajuste ao modelo logístico, para as cultivares e clones de batata plantados em área naturalmente infestada com <i>Ralstonia solanacearum</i> no segundo período (2000/2001). Porto Alegre, RS, 2002.	101
10 - Temperatura média mensal e precipitação pluviométrica durante o período de desenvolvimento da batata na safra de primavera, no município de Caxias do Sul.	102
11 - Resumo da análise de regressão para o ajuste aos modelos epidemiológicos não linearizados de cultivares e clones de batata plantados em área naturalmente infestada por <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar 2. Caxias do Sul, período 1999/2000. Porto Alegre, RS, 2002.	103
12 - Resumo da análise de regressão para o ajuste aos modelos epidemiológicos não linearizados de cultivares e clones de batata plantados em área naturalmente infestada por <i>Ralstonia solanacearum</i> biovar 2. Caxias do Sul, período 2000/2001. Porto Alegre, RS, 2002.	104